



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **PROTEÍNAS SALIVARES COMO BIOMARCADORES DA CÁRIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por  
**João Pedro Nogueira Alexandre**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**outubro de 2015**





# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **PROTEÍNAS SALIVARES COMO BIOMARCADORES DA CÁRIE DENTÁRIA**

Trabalho submetido por  
**João Pedro Nogueira Alexandre**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Carlos Monteiro**

**outubro de 2015**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico o meu trabalho de final de curso aos meus pais, Augusto Alexandre e Natália Alexandre, e à minha irmã Telma Alexandre por todo o apoio e incentivo que sempre me deram, por terem acreditado em mim e por me terem mostrado o verdadeiro sentido da vida, que nunca é tarde para vencer.



## AGRADECIMENTOS

Ao longo deste percurso várias foram as pessoas que de uma forma ou de outra apoiaram e contribuíram em mais uma etapa da minha vida. Família, amigos, colegas, a eles, muito obrigado.

Ao Instituto Superior Ciências da Saúde Egas Moniz, esta *mui nobre academia* que levo no coração, agradeço a oportunidade. Nunca esquecerei o ambiente fabuloso que vivi ao longo destes 5 anos.

Quero agradecer, na qualidade de meu orientador, ao Professor Doutor Carlos Monteiro por me ter apoiado e ajudado, foi espetacular em tudo. Obrigado professor.

Agradeço a todos os professores da faculdade por terem contribuído de forma bastante positiva para a minha formação.

Agradeço aos meus tios Graciosa e Rui agradeço toda a amizade, o apoio e lealdade que sempre mostraram.

Às minhas primas Sofia Carvalho e Inês Carvalho, muito obrigado pela sinceridade que sempre mostraram, pela amizade, e por todo o apoio que senti da parte delas.

A toda a minha família.

Agradeço à minha namorada Inês Saramago por tudo o que passamos juntos e pelo carinho que sempre senti da sua parte.

A todos os funcionários desta academia.

À minha grande amiga Natacha Reis, minha parceira de box, pela paciência e pelo espírito de ajuda que sempre teve durante estes 5 anos, mas principalmente pela amizade que criamos para o resto da vida.

Ao Evandro Gameiro, Miguel Sousa, Mário Leopoldino, José Serafim, João Mestre, João Barros, Rafael Fidalgo, Fernando Henriques, Gonçalo Cravo, Diogo Correia, Diogo Martins, João Montez, Guilherme Machado, e Luís Galvão. Agradeço os momentos que me proporcionaram, todas as aventuras que passamos juntos, todas as guitarradas, e os ensinamentos que me transmitiram.

Muito obrigado.





## **RESUMO**

Diversos estudos têm sido elaborados com o intuito de identificar o vasto número de proteínas presentes na saliva humana, de modo a qualifica-las como biomarcadores específicos para certas doenças. O objetivo deste trabalho foi fazer uma revisão da literatura já existente fazendo referência às várias proteínas salivares no sentido de verificar a sua ação como possíveis biomarcadores para a cárie dentária. Foram revistos diversos estudos e abordadas várias proteínas salivares, bem como as suas funções na cavidade oral. Os estudos revistos revelaram que algumas proteínas salivares apresentavam relação com a suscetibilidade à cárie dentária e outras não.

Neste trabalho foi também revisto o conceito de cárie dentária e todo o mecanismo que envolve o processo da lesão cariosa, desde a sua etiologia, da formação da placa bacteriana até à fase de desmineralização/remineralização.

A cavidade oral possui uma flora bastante diversificada, a saliva contém proteínas com funções bastante complexas, que têm um papel muito importante na manutenção e prevenção da saúde oral, protegendo as mucosas e principalmente mantendo a integridade das estruturas dentárias. Nesta revisão foi abordado também o tema da saliva, a sua composição, as suas funções e a sua utilização como meio de diagnóstico para certas patologias, nomeadamente para a cárie dentária.

**Palavras-chave:** Cárie Dentária, Saliva, Proteínas Salivares, Biomarcador.



## **ABSTRACT**

Countless studies have been elaborated with a purpose, identify the large number of proteins contained in human saliva in order to qualify them as specific biomarkers for certain diseases. The goal of this study-work was to make a revision of the existing literature giving emphasis to the various salivary proteins in order to verify their possible action as biomarker to human caries. Several studies have been reviewed that led to the utilization of many salivary proteins, as well as their functions in oral cavity.

This studies reveals a relation that some salivary proteins imply dental caries susceptibility as well others don't. In this study-work have been reviewed the concept of dental as also all the mechanism that involve the process of caries damage. Since its etiology, to bacterial plaque formation, to the demineralization/remineralization phase.

The oral cavity has a plenty diverse flora. The saliva has proteins with a set of complex functions, having an important role in maintenance and prevention of oral healthcare, protecting the mucous and mainly maintaining the integrity of the dental structures. This revision also aboard the theme saliva, namely its functions, and its utilization as a diagnostic for certain pathologies, for example dental caries.

**Key-words:** Dental Caries, Saliva, Salivary Proteins, Biomarker.



## ÍNDICE GERAL

<b>I.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>II.</b>	<b>DESENVOLVIMENTO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.</b>	<b><i>Cárie Dentária</i>.....</b>	<b>23</b>
1.1.	Conceito .....	23
1.2.	Fatores Etiológicos da Cárie Dentária.....	25
1.3.	Formação da Placa Bacteriana .....	26
1.4.	Dente .....	29
1.5.	Desmineralização .....	32
1.6.	Remineralização .....	34
1.7.	Capacidade Tampão da Saliva .....	35
1.8.	Diagnóstico da Lesão de Cárie Dentária .....	35
1.9.	Métodos de Prevenção da Cárie Dentária .....	37
<b>2.</b>	<b><i>Saliva</i> .....</b>	<b>38</b>
2.1.	Composição.....	39
2.2.	Funções da saliva .....	41
2.3.	Saliva como Método de Diagnóstico .....	43
2.4.	Regulação do Fluxo Salivar .....	43
2.5.	Disfunção Salivar (Xerostomia).....	44
<b>3.</b>	<b><i>Proteínas Salivares</i>.....</b>	<b>46</b>
3.1.	Biomarcador .....	48
3.2.	Proteínas com Atividade Antimicrobiana .....	48
<b>III.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>IV.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>65</b>



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Modelos de adesão que ocorrem entre adesinas bacterianas e a película adquirida .....	27
Tabela 2- Etiologia das lesões não cariosas .....	34
Tabela 3- Comparação entre elementos inorgânicos da saliva (estimulada e não estimulada) e elementos inorgânicos do plasma.....	39
Tabela 4- Glândulas salivares, tipo de secreção e proteínas secretadas .....	41
Tabela 5- A tabela mostra algumas das principais famílias de proteínas salivares .....	47
Tabela 6- Diferentes famílias de Metaloproteases.....	61
Tabela 7- Proteínas salivares e suas concentrações no estado fisiológico/patológico .....	62





## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Digrama de Keys. Este diagrama representa a interação entre os fatores dieta, hospedeiro e microrganismos no desencadear da cárie dentária .....	24
Figura 2- Diagrama de Newbrum. Este diagrama representa a interação dos três fatores do diagrama de Keys (dieta, hospedeiro e microrganismos), mais o fator tempo. Introduz este fator etiológico, uma vez que para este autor a cárie dentária é resultado de um processo crónico, que aparece após algum tempo.....	24
Figura 3- Diferentes bactérias colonizadoras nas diferentes fases da cárie dentária .....	29
Figura 4- Fossas, fissuras, e faces interproximais são as zonas de mais risco para a cárie. Nestas zonas encontram-se uma maior diversidade de espécies bacterianas.....	37
Figura 5- Funções da saliva e dos elementos que a constituem .....	42



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

PRPs- Proteínas ricas em prolina

MMPs- Metaloproteases

MUC- Mucina

HIST- histatina

ALT- ácidos lipoteícos

Mg- Magnésio

Na- Sódio

K- Potássio

Zn- Zinco

Pb- Chumbo

Sr- Estrôncio

Fe- Ferro

F- Flúor

HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-bicarbonato

ENAM- Gene para as enamelinas

AMELAX- Gene para as amelogeninas

PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>- Fosfato

NH<sub>3</sub>- Amoníaco

HIV- (do inglês Human Immunodeficiency Virus)

TNF- Fator de necrose tumoral

IL-37- Interleucina

IL-1b- Interleucina

PRH- Gene para as proteínas ricas em prolina

(OSCN<sup>-</sup>)- Hipotiocianato

(HOSCN<sup>-</sup>)- Hipotiocianoso

(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)- Peróxido de hidrogénio

(SCN<sup>-</sup>)- Tiocianato

IgA- Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

IgM- Imunoglobulina M



## I. INTRODUÇÃO

A cárie dentária é uma doença infecciosa, crônica, de etiologia multifatorial, transmissível, e que se caracteriza pela desmineralização das estruturas dentárias (Lima, 2007; Sala & García, 2013; Struzycka, 2014). É dita como a doença com maior prevalência em todo o mundo com uma taxa de 80 a 90%, sendo que nas crianças é a segunda doença mais prevalente (Simón-Soro & Mira, 2015).

Para que o processo da cárie dentária ocorra é necessário estarem reunidos um certo número de fatores que o vão determinar. Assim, como fatores primários para a cárie aparecem, o hospedeiro, o microrganismo e a dieta. Estes 3 fatores juntamente com o fator tempo são determinantes para que o processo carioso se inicie (Lima, 2007; Sala & García, 2013).

A cárie dentária tem tendência a aumentar com a idade, por isso é importante que haja um bom esclarecimento para com o paciente de todos os métodos de higiene e de prevenção, para que se possa ter uma boa saúde oral, o que se vai refletir depois no seu dia-a-dia e no seu estilo de vida (West & Joiner, 2014).

Todo o processo carioso tem início na formação da película adquirida (biofilme). A película adquirida é uma camada muito fina, amorfa, acelular, constituída por proteínas salivares adsorvidas a outras moléculas, que constitui uma barreira entre a saliva e o dente (Nauntoft, Tenovou, & Lagerlof, 2005). Forma-se pouco tempo depois (nas primeiras 4 horas) de qualquer ato de higiene oral, sendo constituída por íões de cálcio e de fosfato que revestem e protegem toda a superfície exposta do dente. A esta vão-se ligar proteínas e glicoproteínas salivares que por sua vez se unem a elementos de origem bacteriana como, glucanos, ácidos lipoteicoicos, restos glucídicos, e glucosiltransferases. Em conjunto estes compostos vão ter uma ação recetora no sentido de induzir a adesão às bactérias (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014).

Na primeira linha de bactérias colonizadoras do biofilme encontra-se o *streptococos mutans*, este microrganismo tem um papel fundamental na formação da matriz bacteriana extracelular e pode de uma forma rápida modificar toda a estrutura do biofilme dando início ao processo carioso (Klein, Hwang, Santos, Campanella, & Koo, 2015; Sala & García, 2013).

As bactérias que vão colonizar a placa utilizam os hidratos de carbono da dieta como substrato para o seu metabolismo e aderem à superfície da placa bacteriana dando início ao processo carioso (Lima, 2007; Sala & García, 2013; Singh et al., 2015).

Para além da cárie, também existem outras formas de ocorrer desgaste dentário, tais como a erosão, a atrição, a abrasão e a abfração, sendo que a erosão é uma das principais causas desse desgaste (West & Joiner, 2014).

Na prevenção da cárie existem várias medidas que podem ser aplicadas, desde a fluoretação das águas públicas, até medidas autoaplicáveis e aplicadas pelo profissional de saúde. Medidas essas que passam pela aplicação diária de pastas dentífricas, autoaplicação de géis de flúor, bochechos com colutórios, vernizes de flúor, e géis de aplicação pelo profissional (Clark & Slayton, 2014; Sala & García, 2013).

O ambiente da cavidade oral é ideal para o desenvolvimento de uma microflora variada. De há muitos anos para cá que se tem estudado bastante a flora oral e todos os processos em que esta se encontra envolvida, sendo que todos os constituintes estão envolvidos em promover um estado de equilíbrio que leve ao bem-estar oral (Liu & Duan, 2012).

A saliva é um fluido que desempenha inúmeras funções na cavidade oral, sendo responsável pela manutenção do equilíbrio existente entre o processo de remineralização/desmineralização dentária, bem como pela manutenção do pH num valor em que não possa ocorrer desmineralização das estruturas dentárias através da sua capacidade tampão (Dawes et al., 2015; Guo & Shi, 2013).

A saliva é constituída por 99% de água e 1% de moléculas orgânicas e inorgânicas, sendo que apresenta na sua constituição inúmeros componentes que desempenham variadíssimas funções consoante a superfície da cavidade oral em que que estejam a atuar, para além de que uma das suas funções mais importantes é a manutenção da integridade do dente (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Llana-Puy, 2006; Sala & García, 2013). Dentro destas funções pode-se destacar o papel de ótimo lubrificante de todas as superfícies da cavidade oral, a ação antimicrobiana, o seu papel fundamental na formação da película adquirida, na digestão, no paladar e também na remineralização dentária (Dawes et al., 2015; Llana-Puy, 2006; Sala & García, 2013).

A totalidade da saliva que se encontra na cavidade oral é produzida por 3 pares de glândulas chamadas de glândulas *major*, são elas as glândulas parótidas, as glândulas submandibulares e as glândulas sublinguais, responsáveis pela secreção de aproximadamente 93% de toda a saliva produzida. Existe também um número menor de outras glândulas chamadas de glândulas *minor* que secretam cerca de 7% de toda a saliva produzida (Al-Tarawneh, Border, Dibble, & Bencharit, 2011; Carpenter, 2013; Llana-Puy, 2006).

Cada glândula secreta um tipo diferente de saliva e todas as secreções glândulares no seu conjunto vão contribuir para o teor final da saliva. Diariamente as glândulas secretam entre 500 a 700 ml de saliva, sendo que 1,1 ml em média permanece na cavidade oral. A saliva produzida nas glândulas submandibular e sublingual quando em repouso apresenta uma taxa que varia entre 0,25 e 0,35 ml/min, e quando estimulada este valor sobe para 1,5 ml/min. Ao longo do dia, o momento em que se produz maior quantidade de saliva é antes, durante e após as refeições, atingindo a sua produção máxima por volta das 12 horas, caindo durante a noite e principalmente durante o sono (Chiappin, Antonelli, Gatti, & De Palo, 2007; Dawes et al., 2015; Feio & Sapeta, 2005; Sala & García, 2013).

A qualidade e a quantidade da saliva dependem de muitos fatores, sendo um deles o fluxo salivar. Um baixo fluxo salivar vai ter influência nas superfícies da cavidade oral pois ficam menos protegidas. A hipossalivação (redução do fluxo salivar) e a xerostomia (sensação de boca seca) são as duas patologias mais comuns relacionadas com o fluxo salivar (Coimbra, 2015; Deng, Jackson, Epstein, Migliorati, & Murphy, 2015).

Hoje em dia a saliva tem vindo a ser usada como meio de diagnóstico para determinadas doenças uma vez que contêm compostos como proteínas que podem ser ótimos biomarcadores para certas patologias, nomeadamente doenças periodontais e cárie dentária (Al-Tarawneh et al., 2011).

Além disso, a colheita de saliva é um método fácil, não evasivo, de fácil manuseio, de boa disponibilidade e que envolve equipamentos simples, o que contribui muito para que o paciente adira com mais facilidade pois não traz desconforto para este (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Llana-Puy, 2006). Estas características da colheita de saliva podem proporcionar um diagnóstico mais precoce e também uma melhor eficácia na prevenção de doenças sistémicas (Al-Tarawneh et al., 2011).

De todas as proteínas encontradas até hoje na saliva 95% fazem parte dos principais grupos: as proteínas ricas em prolina (PRPs), mucinas, cistatinas, histatinas, alfa-amilase, aglutininas, lisozimas, imunoglobulinas, peroxidase salivar, lactoferrina, entre outras (Triana, Soto, Aleida, & Bernabeu, 2012).

Nos últimos anos têm-se feito vários estudos com a finalidade de encontrar um número cada vez maior de biomarcadores salivares e usar a saliva como meio de diagnóstico para certas patologias orais (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Spielmann & Wong, 2011).

Com a técnica de espectrometria de massa por exemplo, foi possível detetar alguns marcadores que possibilitam uma abordagem mais conclusiva das patologias. A

espectrometria de massa permite uma análise detalhada do proteoma salivar no sentido de encontrar alterações em alguns biomarcadores em termos de expressão ou de modificações pós-tradução provocadas por patologias (Al-Tarawneh et al., 2011).

Deste modo, a utilização da saliva como meio de diagnóstico ou para controlar o desenvolvimento de determinadas patologias torna-se um recurso bastante atrativo (Llena-Puy, 2006).



## **II. DESENVOLVIMENTO**

### **1. Cárie Dentária**

A cárie dentária é um grave problema de saúde, atingindo uma grande parte da população mundial, sendo uma das doenças crônicas mais comuns. Estudos dizem que em todo o mundo a sua prevalência é mais de 40% em crianças, e cerca de 90% na população adulta. Esta ainda afeta 60 a 90% das crianças em idade escolar, havendo países em que o diagnóstico de cárie dentária severa se verifica em todas as faixas etárias. Contudo tem havido uma redução drástica da sua taxa de incidência, o que se revela um bom pressuposto (Guo & Shi, 2013; Struzycka, 2014).

#### **1.1. Conceito**

O conceito de cárie dentária é mundialmente conhecido como sendo uma doença infecciosa, crônica, de origem bacteriana, de etiologia multifatorial, transmissível e caracterizada pela desmineralização dos tecidos duros das estruturas dentárias em consequência da ação de compostos ácidos gerados pelo metabolismo dos microrganismos que utilizam os hidratos de carbono presentes na cavidade oral como substrato para o seu metabolismo (Lima, 2007; Sala & García, 2013; Sousa, 2014).

A principal causa desta patologia, segundo a tríade de Keyes (1962), deve-se à interação de 3 fatores principais: hospedeiro/dente suscetível, dieta rica em hidratos de carbono e presença de microrganismos (Figura 1).

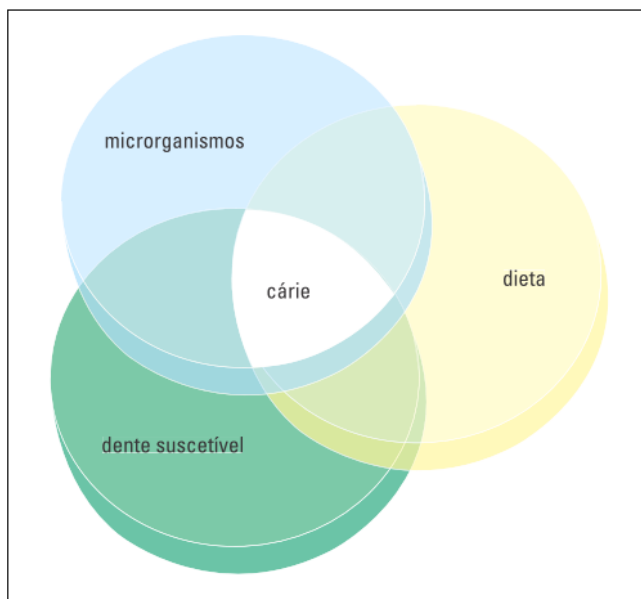


Figura 1- Digrama de Keys. Este diagrama representa a interação entre os fatores dieta, hospedeiro e microrganismos no desencadear da cárie dentária (adaptado de Lima, 2007).

Mais tarde, Newbrun (1978) acrescenta o fator tempo, uma vez que para este autor todo o processo carioso não é instantâneo e requer tempo para que seja processado. Portanto, estes 3 fatores juntamente com o fator tempo são os elementos necessários para que ocorra a desmineralização dentária, constituindo os fatores primários da cárie dentária (Figura 2).

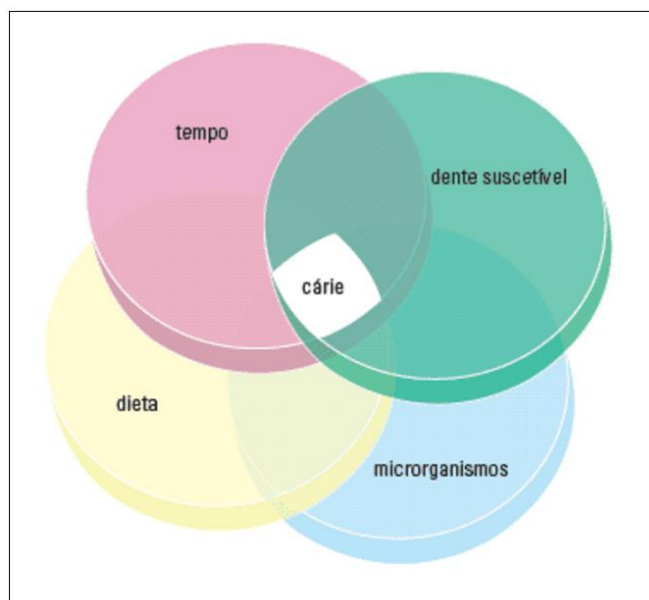


Figura 2- Diagrama de Newbrun. Este diagrama representa a interação dos três fatores do diagrama de Keys (dieta, hospedeiro e microrganismos), mais o fator tempo. Introduce este fator etiológico, uma vez que para este autor a cárie dentária é resultado de um processo crônico, que aparece após algum tempo (adaptado de Lima, 2007).

## 1.2. Fatores Etiológicos da Cárie Dentária

### 1.2.1. Fator Hospedeiro

Em relação ao fator hospedeiro, existem fatores extrínsecos e intrínsecos que determinam a sua suscetibilidade para a cárie dentária, individualizando a suscetibilidade do indivíduo como um todo e a do dente. Assim, em relação ao hospedeiro como um todo, o nível socioeconómico e cultural, o estilo de vida, os comportamentos e as atitudes face à saúde oral correspondem aos fatores extrínsecos, sendo que os fatores intrínsecos são a saliva, a hereditariedade e a imunologia. No que diz respeito ao dente, como fatores extrínsecos temos as características ambientais e locais e como fatores intrínsecos o grau de mineralização/maturação, a composição, a estrutura e a morfologia do esmalte dentário (Lima, 2007; Struzycka, 2014).

### 1.2.2. Fator Microrganismo

Em relação ao fator microrganismos sabe-se que existe um vasto grupo de bactérias que desencadeiam o processo carioso, entre as quais encontramos a *Streptococcus mutans*. E este processo ocorre aquando da presença de placa bacteriana (Lima, 2007; Simón-Soro & Mira, 2015). Contudo existem estudos que explicam que a presença na cavidade oral do *streptococcus mutans* não confirma que haverá cárie dentária, uma vez que este pode ser neutralizado com métodos de prevenção. A presença de microrganismos é um fator participativo mas não determinante para o surgimento da cárie dentária. Estudos conseguem provar que existe uma relação direta entre a cárie dentária a presença de microrganismos, o fluxo salivar, a capacidade tampão da saliva e a dieta. A presença de microrganismos é importante no processo carioso devido ao seu metabolismo. Assim, consoante a fase em que se encontra o desenvolvimento da lesão cariosa encontramos diferentes tipos de bactérias (Lima, 2007; Simón-Soro & Mira, 2015; Struzycka, 2014).

Na cavidade oral estes microrganismos fazem parte da flora comum, existindo um equilíbrio dinâmico entre as bactérias e o meio ambiente em que elas se encontram. Equilíbrio este, que vai ser alterado devido ao aumento de hidratos de carbono utilizados para o metabolismo das bactérias cariogénicas, originando os ácidos que vão provocar a diminuição do pH. Assim, quando o valor do pH se encontra abaixo do valor chamado

valor crítico, que é de 5 a 5,5, ocorre desmineralização das estruturas dentárias (Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013; Struzycka, 2014).

### **1.2.3. Fator Dieta**

Considera-se que uma dieta pode ser cariogénica consoante a quantidade/tempo de hidratos de carbono que permanecem na boca, sendo que estes, principalmente a sacarose, são utilizados como substrato pelos microrganismos para sintetizarem polissacarídeos essenciais para a formação da placa bacteriana e formação de ácidos que vão promover a desmineralização das estruturas dentárias (Lima, 2007; Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013).

Desta forma, a ingestão prolongada de alimentos cariogénicos pode desencadear o processo de lesão cáries, uma vez que os ácidos produzidos vão comprometer a capacidade tampão da saliva, começando a ocorrer a desmineralização dentária. Portanto, a frequência com que os alimentos são ingeridos, a hora do dia, a consistência dos alimentos, a presença ou ausência dos fatores protetores e o tipo de hidratos de carbono que são ingeridos são os fatores mais importantes que podem desencadear o processo de lesão por cárie dentária (Lima, 2007; Struzycka, 2014).

Existem outros fatores que podem influenciar a lesão por cárie dentária, tanto no início como durante a progressão, assim como a sua intensificação, sendo estes designados por fatores secundários, tais como o nível socioeconómico do hospedeiro, a presença de flúor na cavidade oral, o estado de higiene, o estado de saúde geral e a predisposição genética do hospedeiro (Lima, 2007; Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013).

### **1.3. Formação da Placa Bacteriana**

A primeira fase da formação da placa bacteriana é a formação da película adquirida (biofilme). O biofilme são comunidades de microrganismos unidos entre si e a superfície do dente, dispostos em uma estrutura dinâmica e tridimensional, embebidos numa matriz de polímeros extracelulares produzidos por eles mesmos (Høiby et al., 2011; Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013). Primeiramente, a saliva que envolve as superfícies dentárias forma uma capa, esta é constituída por íons de cálcio e de fosfato. A estes vão-se unir proteínas e glicoproteínas salivares, do mesmo modo que se unem compostos de origem bacteriana como glucosiltransferases, glucanos, ácidos

lipoteicoicos, e restos glucídicos. Todos estes elementos vão ter uma função na ligação às bactérias (Sala & García, 2013).

As proteínas da película adquirida ligam-se irreversivelmente a moléculas localizadas na superfície das bactérias conhecidas como adesinas. As bactérias aderidas desenvolvem-se rapidamente dando assim início à formação da placa bacteriana (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014; Vasudevam, Sreekumari, & Vaidyanathan, 2011). O *streptococos mutans* juntamente com o *streptococos sanguinis* são as primeiras bactérias a colonizar a película adquirida e a dar início ao processo de formação da lesão por cárie dentária (Klein et al., 2015; Nauntoft et al., 2005).

Tabela 1- Modelos de adesão que ocorrem entre adesinas bacterianas e a película adquirida (adaptado de Sala & García, 2013).

	Bactéria	Adesinas	Recetor
Proteína-proteína	<i>Actinomyces naeslundii</i> <i>Streptococos mutans</i>	Fímbrias do tipo I Antigénio I/II	PRP PRP
Lectina-Hidratos de carbono	<i>Streptococos sanguinis</i>	Proteínas parietais	Ácido siálico de proteínas salivares
Mediadas por glucanos	<i>Streptococos spp</i>	Glucosiltransferases e glucanos	Recetores de glucanos
Mediadas por ácidos lipoteicoicos	Bactérias gram-positivas	Extremos hidrófilos e hidrófobos	Superfícies hidrófobas e hidrófilas de células e capa de saliva

Os microrganismos na cavidade oral dão origem a duas formas de placa, placa supragengival e placa subgengival. Na placa supragengival pode-se encontrar as bactérias gram-positivas como o *streptococos mutans*, *streptococos salivarius* e *lactobacilos*. Na placa subgengival predominam as bactérias gram-negativas e anaeróbias, como o *lactobacillus*, *campylo-bacter spp.*, *fusubacterium nucleatum*, *porphyromonas gingivalis* (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014).

A cárie dentária está normalmente associada à placa supragengival e ao *streptococos mutans*, enquanto a placa subgengival está associada à gengivite e à periodontite (Struzycka, 2014).

Como foi referido, a placa bacteriana forma-se a partir da película adquirida sendo esta determinante para a sua formação. A película adquirida cobre todas as superfícies

das estruturas da cavidade oral, nomeadamente dos dentes e a sua formação passa por um processo de adsorção seletiva (Cárdenas, Elofsson, & Lindh, 2007; Sala & García, 2013). Esta película é constituída por várias proteínas, entre as quais se encontram as proteínas ricas em prolina (PRP), as adesinas, as mucinas, a tirosina, a histidina, as aglutininas e as glicoproteínas. Estas proteínas vão-se juntar e ligar às bactérias, sendo que a primeira e principal bactéria a colonizar a película é o *streptococos mutans*, juntamente com o *streptococos sanguinis*, o *lactobacilo*, o *streptococos oralis*, o *actinomyces spp*, entre outras, formando assim a placa bacteriana que se não for removida poderá dar início ao processo da lesão cariosa (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014; Vasudevam etd al., 2011).

O potencial de cariogenicidade do *streptococos mutans* deve-se ao fato de este microrganismo apresentar uma capacidade de produzir ácidos de forma rápida usando o sistema fosfoenolpiruvato fosfotransferase. Assim atinge o pH crítico, ótimo para a desmineralização das estruturas dentárias. Para além disso, tem ação acidúrica e forte resistência aos ácidos (Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013).

A presença de placa bacteriana por si só, não significa que poderá vir a existir lesão cariosa, uma vez que esta pode ser facilmente removida por controlo mecânico. De modo a que possa ocorrer todo o processo da lesão por cárie será então necessário que para além de placa bacteriana exista também uma ingestão regular de alimentos cariogénicos, a saliva não atuar como protetora, o controlo mecânico ser deficiente e o hospedeiro ser suscetível, (Lima, 2007; Llana-Puy, 2006; Struzycka, 2014; Vasudevam et al., 2011).

Simón-Soro & Mira (2015) mostraram que ao longo do processo carioso existem diferentes bactérias que colonizam durante as diferentes fases do processo de lesão cariosa (Figura 3).

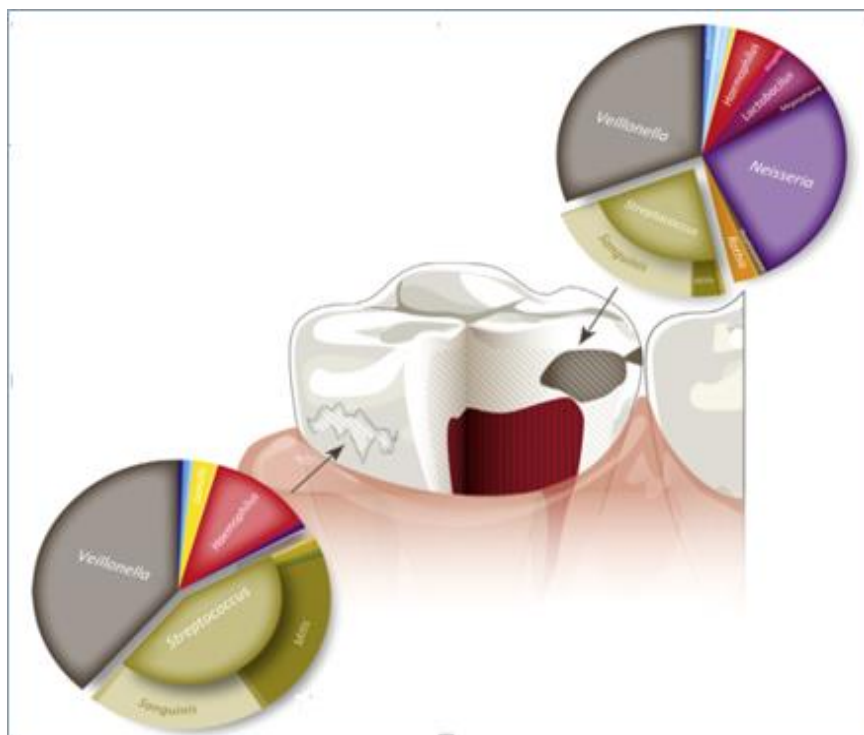


Figura 3- Diferentes bactérias colonizadoras nas diferentes fases da cárie dentária (adaptado de Simón-Soro & Mira, 2015).

## 1.4. Dente

A coroa e a raiz constituem o dente propriamente dito, o qual é formado por uma porção mineralizada, constituída por hidroxiapatite, e outra não mineralizada. A coroa é constituída pelo esmalte, pela dentina e pela polpa. O esmalte, a porção mais superficial do dente, é também a mais mineralizada de todas as camadas, e apresenta um papel protetor. A única camada não mineralizada é a polpa, constituída por nervos e vasos sanguíneos. A envolver a raiz do dente encontram-se o cimento e o ligamento periodontal (Díaz-monroy et al., 2014; Goldberg, Kulkarni, Young, & Boskey, 2011; Vasudevam et al., 2011; West & Joiner, 2014).

### 1.4.1. Componentes Inorgânicos do Dente

O principal componente inorgânico do dente é a hidroxiapatite  $[(Ca_5(PO_4)_3(OH))]$ , a qual está presente no esmalte, na dentina, e também no osso. Os íons de cálcio e fosfato são os principais elementos usados para a formação dos cristais de hidroxiapatite. Além da hidroxiapatite também fazem parte dos componentes inorgânicos do dente elementos

como, magnésio, sódio, potássio, zinco, chumbo, estrôncio, ferro, flúor e bicarbonato (Vasudevam et al., 2011).

#### **1.4.1.1. Cálcio**

O cálcio é o elemento inorgânico mais abundante na saliva podendo ser encontrado a pH fisiológico em várias formas, cálcio ionizado (cerca de 50%), cálcio ligado a fosfatos e bicarbonatos (entre 10 e 20%), na forma de proteínas (cerca de 10%), associados ao citrato (cerca de 10%). Um dos motivos do surgimento com mais frequência de placa bacteriana nos dentes anteriores inferiores pode ser devido à maior concentração de cálcio na saliva secretada pela glândula sublingual em relação aquela que se encontra na saliva secretada pela glândula parótida (Levine, 2011).

O cálcio como elemento inorgânico mais abundante vai ter um papel importante na mineralização funcionando como depósito dos cristais de hidroxiapatite. Este interage com várias proteínas como as PRPs participando nos mecanismos de adesão das bactérias da cavidade oral. Contudo, as concentrações de cálcio podem ser modificadas pela ação de agentes nocivos que destroem essas proteínas, como pelas variações do pH.

A pH fisiológico as concentrações de cálcio e de fosfato encontram-se altas estando a saliva supersaturada em relação à hidroxiapatite. Deste modo, quando se verifica uma diminuição do pH a concentração de hidrogénio aumenta, uma vez que os fosfatos são transformados em ácido fosfórico e os iões hidroxilo anulados para formar água, desta forma a saliva não se encontra supersaturada em relação à hidroxiapatite. Por outro lado um aumento do pH favorece a remineralização uma vez que a saliva se torna supersaturada (Levin, 2011).

#### **1.4.1.2. Fosfato**

Na saliva, o fosfato pode estar em várias formas, sendo a principal a forma iónica (aproximadamente 60%). As restantes formas em que se encontra são: ATP, fosfolípidos e fosfatos de glucose (cerca de 10%), pirofosfatos (aproximadamente 10%) e associados ao cálcio (cerca de 20%). O fosfato salivar é produzido maioritariamente na célula serosa da glândula parótida, tendo uma concentração maior que a encontrada no plasma. A concentração dos fosfatos diminui na estimulação, pois as células estão a consumir ATP para produzir saliva e o fosfato é utilizado. Quando há estimulação, só baixam as



concentrações de fosfato e de magnésio. Em relação às suas funções, o fosfato é um importante reservatório para a mineralização, pois há desmineralização do dente quando diminui o pH. O fosfato é ainda um importante tampão no metabolismo bacteriano (Levine, 2011; Nauntoft et al., 2005).

## **1.4.2. Componentes Orgânicos do Dente**

### **1.4.2.1. Proteínas do Esmalte**

Na formação do esmalte dentário as amelogeninas e as enamelinas são as proteínas mais importantes e mais abundantes. Da interação entre estas duas proteínas resulta uma malha bem resistente e rica em nutrientes. As amelogeninas e as enamelinas fazem também parte da matriz extracelular do esmalte. Para além destas duas proteínas, as ameloblastinas e as tuflinas também entram na formação do esmalte dentário (Fan et al., 2011b; Vasudevam et al., 2011; Yoshizaki & Yamada, 2013).

As amelogeninas são proteínas de baixo peso molecular (entre 20 e 30 KDa), são glicosiladas, ricas em prolina, histidina, leucina, e Glutamina. Contudo encontraram-se várias amelogeninas com diferentes pesos moleculares e com diferentes composições em aminoácidos. O seu valor de pH varia entre 6,5 e 7. As amelogeninas são proteínas hidrofóbicas, e encontram-se em maior número na fase de desenvolvimento do esmalte dentário, durante a fase secretora dos Ameloblastos, chegando a constituir 90% do conteúdo proteico da matriz. Na fase de mineralização o seu número é reduzido chegando a constituir 2% (Vasudevam et al., 2011).

Segundo o estudo realizado por Gasse et al. (2013) verificou-se que o gene AMELX correspondente à proteína amelogenina não apresenta nenhuma associação com a suscetibilidade dos indivíduos à cárie dentária (Gasse et al., 2013).

A formação do esmalte dentário acontece antes da erupção do dente, através dos ameloblastos (células principais do esmalte) que vão segregar proteínas como as amelogeninas e as enamelinas que vão constituir uma malha (matriz) mineralizada que vai sendo depositada até formar o esmalte dentário. O esmalte dentário é o componente mais resistente que existe no ser humano, resiste ao desgaste e a forças que podem provocar fratura. A junção amelodentinária exerce um papel de suporte evitando alterações no esmalte (Fan et al., 2011b; Moradian-Oldak, 2013).

As enamelinas são proteínas de alto peso molecular, secretadas pelos ameloblastos durante a formação do esmalte. Estas proteínas representam cerca de 10% do conteúdo proteico do esmalte jovem. Apresentam-se estáveis quando secretadas, ligando-se à superfície do esmalte em formação. Existem ainda autores que afirmam que as enamelinas funcionam como inibidores quando o crescimento do cristal é excessivo, papel que contraria com a sua principal função. (Chaussain et al., 2014; Fan et al., 2011; Moradian-Oldak, 2013).

Segundo o estudo realizado por Chaussain et al. (2014) verificou-se que o gene ENAM correspondente à proteína enamulina é um forte candidato para a determinação da suscetibilidade dos indivíduos à cárie dentária.

Concluindo, as enamelinas, as ameloblastinas e as proteinases exercem funções importantes na formação do esmalte dentário, sendo que a matriz torna-se muito mais resistente com a junção das amelogeninas com as enamelinas (Fan et al., 2011a).

### **1.5. Desmineralização**

O dente pode sofrer desmineralização por cárie (com ação bacteriana), por erosão, por atrição, por abrasão e por abfração, sendo que estas últimas quatro não têm ação bacteriana e, portanto são lesões não cariosas. A desmineralização dentária ocorre quando começa a haver deterioração das superfícies dentárias, provocada pela longa ação das bactérias como o *streptococos mutans*. Os hidratos de carbono servem de fonte de energia para o metabolismo bacteriano para produzirem ácido láctico e começar o processo de desmineralização dentária (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014; West & Joiner, 2014).

A desmineralização das superfícies dentárias pode ocorrer também pela erosão, que pode ter causas intrínsecas ou extrínsecas, sendo que as causas intrínsecas são os ácidos gástricos provenientes de refluxo gastroesofágico, vômitos, e regurgitação, estes ácidos vão baixar o pH para um valor crítico de 5,5 tornando o meio da cavidade oral um meio ácido, resultando na dissolução do esmalte dentário. A erosão por causas extrínsecas é provocada por exemplo por ação de alimentos ácidos, bebidas ácidas, piscinas com pH baixo, trabalhadores que estejam expostos diariamente sem proteção a ambientes ácidos e uso de medicamentos (Grippe, Simring, & Schreiner, 2004; West & Joiner, 2014)

A abrasão, outra forma de degradação do esmalte dentário, é provocada pelo uso de instrumentos mecânicos para remoção de placa, escovagens excessivas, destartarizações, hábitos orais e próteses mal adaptadas. O esmalte começa a ficar com

uma textura mole e se de alguma forma não for reparado este começa a ser dissolvido (Sala & García, 2013; Struzycka, 2014; West & Joiner, 2014). Normalmente as lesões de abrasão estão associadas às zonas cervicais do dente, resultando nos casos mais graves em sensibilidade dentária (West & Joiner, 2014).

O valor crítico do pH foi determinado inicialmente por Ericsson em 1949 (citado por West & Joiner, 2014) e foi dado por questões de precaução. Hoje em dia, que o valor crítico do pH situa-se entre 4,5 a 5,5 (West & Joiner, 2014).

A atrição é a causa fisiológica de desgaste das superfícies dentárias, pelo contacto excessivo do bordo incisal dos dentes anteriores superiores com o bordo incisal dos dentes anteriores inferiores, e da face oclusal dos dentes posteriores superiores com a face oclusal dos dentes inferiores posteriores. Torna-se numa situação com mais gravidade em pacientes que tenham bruxismo (Grippio et al., 2004; West & Joiner, 2014).

Um estudo realizado Eisenbuger em 2002 (citado por West & Joiner, 2014) mostra que a capacidade que os dentes têm quando lubrificados com água em resistir as forças de atrito é menor que as forças de atrito suportadas por dentes lubrificados com saliva, isto prova a capacidade que a saliva tem na proteção dos dentes.

As lesões de abfração ocorrem nas zonas cervicais dos dentes, onde existe uma maior concentração de forças. As forças exercidas são de flexão e provocam uma rotura na camada fina do esmalte, assim como microfratura do cimento e da dentina (Grippio et al., 2004).

Com o aumento da idade, estas lesões têm tendência a aumentar uma vez que o periodonto começa a ficar mais rijo e a sua capacidade de absorver as forças oclusais fica comprometida (Xavier, Pinto, & Cavalcanti, 2012).

A tabela 2 mostra a etiologia das lesões não cariosas. A atrição e abrasão aparecem como duas formas de fricção, em que a atrição é de causa endógena e a abrasão de causa exógena.

Tabela 2- Etiologia das lesões não cariosas (adaptado de Grippo et al., 2004)

Etiologia das lesões não cariosas	
Mecanismos Patogénicos	Fatores Etiológicos
Stress (Microfratura/Abfração)	Parafunção (como bruxismo e aperto) Oclusão (contactos prematuros, forças excessivas) Deglutição Mastigação Hábitos (como mastigar canetas e outros) Exposição ocupacional Aplicações dentárias (como uso de fio dentário e uso de próteses dentárias)
Erosão (Desmineralização química)	Placa (bactérias acidogénicas e proteolíticas) Fluido crevicular Suco gástrico (refluxo gastroesofágico, bulimia) Consumo de bebidas ácidas Exposição ocupacional a ácidos e gases industriais
Fricção Atrição Abrasão	Parafunção (como bruxismo e aperto) Deglutição Mastigação Uso inadequado da escova de dentes, do dentífrico, e do fio dentário Hábitos Prótese e aparelhos ortodônticos

## 1.6. Remineralização

A saliva apresenta capacidade tampão pois cavidade oral consegue anular o efeito cariogénico dos ácidos, repondo o pH nos valores ideais para que não ocorra a desmineralização dentária, ou seja, existe um equilíbrio entre a placa bacteriana e a dieta cariogénica, em que a saliva atua como meio de defesa. O meio oral está em permanente equilíbrio com o processo desmineralização/remineralização e a saliva não só pela sua capacidade tampão, mas também por conter iões de cálcio, de fosfato e de flúor na sua composição promove a remineralização dentária (Lima, 2007; Struzycka, 2014; Vasudevam et al., 2011). O ião de flúor inibe a desmineralização das superfícies dentárias formando apatite fluorada  $[Ca_{10}(PO_4)_6F_2]$  que é menos solúvel e mais resistente á ação dos ácidos (Levine, 2011).

O processo de remineralização traz de volta a integridade do dente, de novo uma superfície com brilho, sem que no entanto tenha desaparecido a cor branca. Quando a remineralização é parcial, toda a superfície do dente apresenta uma cor opaca, sem brilho (Carvalho, Godoy, & Bastos, 2002).

### **1.7. Capacidade Tampão da Saliva**

A saliva exerce forte efeito tampão, ou seja, consegue neutralizar o efeito desmineralizante dos ácidos presentes na cavidade oral deixando o pH não desça para o valor crítico (5,5) favorável ao processo de desmineralização (Dawes et al., 2015; Guo & Shi, 2013; Vasudevam et al., 2011).

A saliva exerce efeito tampão através do sistema de bicarbonato, dos aminoácidos, das proteínas e da ureia. Quando o pH intraoral se encontra baixo, estes sistemas atuam, resultando na formação de compostos alcalinos que vão neutralizar o efeito ácido. As proteínas são transformadas em péptidos e estes por sua vez através da ação das peptidases são convertidos em aminoácidos que ao sofrerem outros tipos de alterações dão origem a formas básicas. Exerce também efeito tampão pelos fosfatos, pelas histatinas, e pela sialina, este último é transformado em amoníaco e putrescina que fazem aumentar os valores do pH (Dawes et al., 2015; Guo & Shi, 2013; Lima, 2007; Sala & García, 2013).

### **1.8. Diagnóstico da Lesão de Cárie Dentária**

O diagnóstico da cárie dentária por parte do médico dentista exige deste um conhecimento aprofundado da prática a realizar. Cabe ao médico dentista realizar um bom e correto diagnóstico da lesão de cárie, o que tem vindo a ser cada vez mais difícil devido às várias alterações, tanto no aspeto clínico, como no padrão de desenvolvimento, e até pela redução da sua prevalência. O profissional deve ser capaz de distinguir lesão ativa de lesão inativa, mostrar confiança, saber diferenciar a doença pelos seus sinais e sintomas. Deve estar ainda preparado no sentido de saber efetuar um diagnóstico precoce a fim de evitar um tratamento mais evasivo (Soares, Souza, Purger, Vasconcellos, & Ribeiro, 2012).

Os médicos dentistas utilizam o exame visual e o exame tátil. Antes de proceder ao exame visual a superfície do dente deverá estar livre de placa, sendo esta removida se necessário. A sonda exploratória deverá ser utilizada para sentir a textura do dente, para ver se apresenta cavitação ou não, e para retirar o excesso de placa que envolve a superfície do dente de modo a facilitar o diagnóstico da lesão cariosa (Sala & García, 2013). No diagnóstico da cárie, para além destes métodos clínicos, o médico dentista poderá fazer outro tipo de exames complementares, como por exemplo radiografias

interproximais (*bitewings*) para detetar lesões de cárie nas superfícies proximais dos dentes, para além de periapicais, ortopantomografia, e também raios x baseados em luz e raios x baseados em corrente elétrica (Sala & García, 2013).

As lesões no esmalte e na dentina são classificadas consoante a sua localização na superfície do dente, sendo as fossas, fissuras, faces interproximais e margem gengival são as zonas mais afetadas uma vez que são mais favoráveis à retenção de placa bacteriana e de difícil acesso para higienizar (Sala & García, 2013).

No início, a lesão de cárie dentária apresenta-se como uma lesão branca, de superfície opaca, que não apresenta cavitação. Mas ao longo do tempo, e com o decorrer do processo de desmineralização, a lesão de cárie dentária vai-se agravar apresentando-se com diferentes texturas, quer no esmalte quer na dentina. Assim quando se fala em cárie ativa de esmalte a superfície deste encontra-se rugosa, de cor branca, opaca e sem brilho. Quando se fala em cárie inativa de esmalte, este apresenta-se com cor branca, superfície opaca, dura, lisa e brilhante. Na dentina a lesão de cárie é designada por cárie ativa quando apresenta uma cor amarela ou castanho claro, é mole e de superfície rugosa. Quando se fala em cárie inativa da dentina, esta apresenta uma superfície que pode ou não apresentar cavitação, de cor castanha escuro ou preto, dura e lisa. É importante salientar também que existem métodos preventivos como a aplicação de flúor em conjunto com a ação tampão da saliva que evitam a desmineralização enquanto não existir cavitação. Após existir cavitação a lesão torna-se irreversível, tendo-se que recorrer a tratamento restaurador (Sala & García, 2013; Soares et al., 2012; Struzycka, 2014).

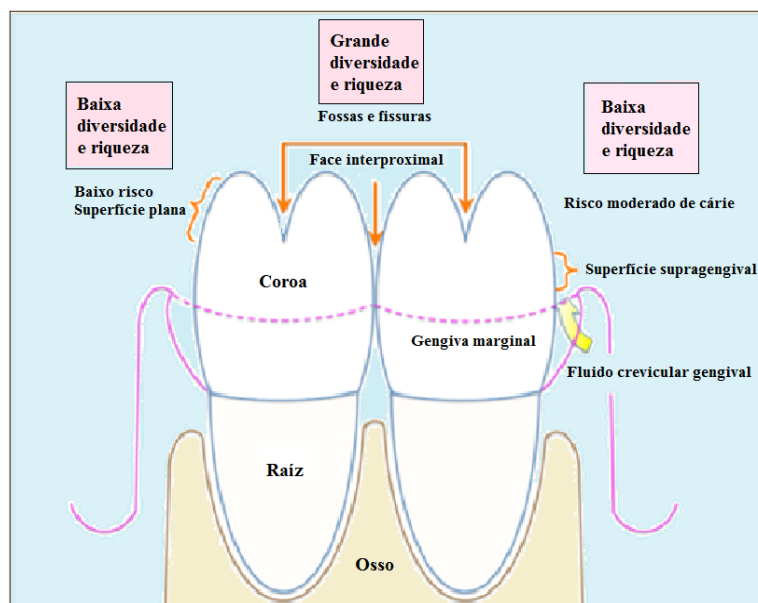


Figura 4- Fossas, fissuras, e faces interproximais são as zonas de mais risco para a cárie. Nestas zonas encontram-se uma maior diversidade de espécies bacterianas (adaptada de Costalonga & Herzberg, 2014).

## 1.9. Métodos de Prevenção da Cárie Dentária

Na prevenção da cárie, a fluoração da água de consumo público tem vindo a ser desde há muitos anos a medida mais aplicada com resultados bastante satisfatórios. Em populações em que a prevalência de cárie é baixa mas o risco de cárie é elevado em crianças, é aconselhável a toma de suplementos de flúor orais, sempre com o conhecimento das concentrações de flúor que apresentam as águas públicas, para evitar a fluorose (Olivier, 2014; Sala & García, 2013).

Existem outras medidas de prevenção para a cárie dentária em crianças e adolescentes, como o uso de colutórios a 0,05% (230 ppm de flúor), usado diariamente (baixa potência e alta frequência) e a 0,2% (920 ppm de flúor), uso semanal ou quinzenal principalmente em programas escolares (alta potência e baixa frequência). É importante que não tenham álcool, principalmente quando receitados a crianças e a adultos com xerostomia (Sala & García, 2013).

Além do uso dos colutórios é importante o uso diário de dentífricos fluoretados, pois a sua ação é fundamental na prevenção da cárie dentária, já que aderem diretamente à placa bacteriana e ao esmalte desmineralizado. As suas concentrações variam entre 250 ppm e 5000 ppm, sendo este último normalmente apresentado em forma de gel. Pode-se usar também géis de autoaplicação, vernizes e géis de flúor, sendo estes 2 últimos aplicados pelo profissional. No entanto, quando já existe placa formada e esta for supra

gingival é necessário removê-la com recurso a instrumentos manuais, como curetas e cinzeis, ou aparelhos ultra-sónicos. Quando existe formação de placa infra gengival deveram ser realizados alisamentos radiculares com uso de curetas (Sala & García, 2013).

O uso de dentífricos fluoretados vai ser determinante na remineralização uma vez que vão determinar um mínimo diário de iões fluoretados na saliva e na placa tornando o esmalte e o cimento com menos solubilidade (Sala & García, 2013).

A ingestão excessiva de flúor pode ser tóxico e provocar, além de náuseas, vômitos, mau estar, diarreia, entre outros, no caso de ingerido em excesso principalmente durante a formação do dente e do osso provoca fluorose que é o resultado de uma hipomineralização. A faixa etária que apresenta uma maior incidência de fluorose são as crianças com menos de 8 anos (Clark & Slayton, 2014; Sala & García, 2013).

## **2. Saliva**

A cavidade oral é constituída por diversas estruturas, em que cada uma é favorável ao crescimento de uma microflora variada. Como na cavidade oral existe um ambiente quente, húmido e rico em nutrientes fortemente favorável ao crescimento dos microrganismos, a saliva exerce um papel fundamental no equilíbrio ecológico, sendo importantíssima para a manutenção da saúde oral (Hof, Veerman, Amerongen, & Ligtenberg, 2014).

A saliva é produzida pelo complexo ácino-canalicular em resultado de métodos fisiológicos de secreção. Os ácinos e os canais intercalares estão envolvidos pela célula mioepitelial, podendo esta ser de origem serosa, mucosa ou mista consoante o tipo de glândula envolvida (Almeida, 2007).

A formação da saliva passa por dois processos, primeiro no ácino e depois pelo sistema de ductos onde é transformada por reabsorção seletiva de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  e secreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{HCO}_3^-$  (Nauntoft et al., 2005). Os ácinos e os ductos nas suas superfícies apresentam recetores onde se vão ligar a neurotransmissores e assim darem início a uma série de processos bioquímicos que levam à secreção da saliva primária e à sua modificação no sistema ductal (Nauntoft et al., 2005). De seguida as células aqüares vão sintetizar proteínas e libertá-las. No entanto nos ductos também ocorre a síntese de proteínas, que são incluídas na saliva final e secretadas na cavidade oral (Nauntoft et al., 2005).



## 2.1. Composição

A saliva é um dos fluídos mais importantes presentes no nosso organismo, apresenta-se como um fluido viscoso, é constituída predominantemente por água (95-99,5%) e apresenta uma parte inorgânica e outra parte orgânica. A saliva é vital para a manutenção do ambiente equilibrado da cavidade bucal, uma vez que contém agentes antimicrobianos essenciais, proteínas, imunoglobulinas e eletrólitos, todos favorecendo a capacidade de tampão da saliva (Sala & García, 2013). A sua composição é diferente consoante o tipo de glândula secretora, assim como da etologia do estímulo que é utilizado e da sua duração (Nauntoft et al., 2005).

### 2.1.1. Elementos Orgânicos e Inorgânicos da Saliva

Em relação à sua composição orgânica a saliva apresenta uma grande diversidade. Assim, como principais constituintes orgânicos da saliva encontram-se os lípidos (colesterol, ácidos gordos, triglicéridos), glúcidos (glucose), proteínas (hormonas, enzimas, imunoglobulinas, mucinas, citoquinas, entre outras), ácido úrico, bilirrubina, creatinina, lactato, etc.(Almeida, 2007; Carpenter, 2013; Dawes et al., 2015; Sala & García, 2013). Como constituintes inorgânicos da saliva encontram-se os iões de sódio, potássio, cálcio, magnésio, fosfato, cloro, bicarbonato, flúor, entre outros (Sala & García, 2013).

Tabela 3- Comparação entre elementos inorgânicos da saliva (estimulada e não estimulada) e elementos inorgânicos do plasma (citada por Martens em 2005, adaptada de Chiappin et al., 2007).

Componentes inorgânicos (mmol/l)	Saliva não estimulada	Saliva estimulada	Plasma
Na <sup>+</sup>	5	20-80	145
K <sup>+</sup>	22	20	4
Cl <sup>-</sup>	15	30-100	120
Ca <sup>2+</sup>	1-4	1-4	2.2
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	5	15-80	25
Mg <sup>2+</sup>	0.2	0.2	1.2
NH <sub>3</sub>	6	3	0.05

Por dia são secretados para a cavidade oral entre 500 e 1500 ml de saliva, sendo cerca de 90% da totalidade da saliva produzida pelos três pares de glândulas salivares mais importantes, as parótidas, as submandibulares e as sublinguais, chamadas as glândulas *major*, e em menor quantidade por mais de 400 a 500 glândulas salivares que são as chamadas glândulas *minor*, que secretam os restantes 10% da saliva produzida. Estas preenchem toda a mucosa oral exceto a parte anterior do palato duro e região gengival, chamadas as, Labiais, linguais, palatinas, bucais, glossopalatinas e retromolares (Falcão, da Mota, Pires, & Bezerra, 2013; Feio & Sapeta, 2005; Sala & García, 2013).

Cada glândula produz um diferente tipo de saliva e a sua quantidade muda consoante o estado fisiológico da glândula, e se é ou não estimulada. Assim pode-se encontrar produção de saliva serosa pelas glândulas parótidas que representa 20-25% da saliva produzida sem ser estimulada, ou seja, em repouso. Nas glândulas submandibulares encontra-se secreção mista, ou seja, tanto serosa como mucosa e representam entre 60 e 65% de toda a saliva produzida, também no estado de repouso (Almeida, Grégio, Machado, Lima, & Azevedo, 2008; Carpenter, 2013; Feio & Sapeta, 2005). As glândulas salivares sublinguais secretam saliva serosa e mucosa com predominância na secreção mucosa e representam cerca de 7 a 8% de toda a saliva produzida. As glândulas *minor* produzem secreção serosa e mucosa. Em presença de estímulo as glândulas salivares vão aumentar a produção de saliva, assim as glândulas parótidas quando estimuladas vão produzir entre 50 e 70% da saliva total, esta saliva apresenta-se aquosa, e de textura fina (ver tabela 4) (Carpenter, 2013; De Almeida, Grégio, Machado, De Lima, & Azevedo, 2008; Feio & Sapeta, 2005; Benn & Thomson, 2014).

Tabela 4- Glândulas salivares, tipo de secreção e proteínas secretadas (adaptado de Been &amp; Thomson, 2014).

Glândula	Tipo de secreção	Componentes
Parótida	Serosa	Amilase Proteínas ricas em prolina Aglutinas Cistatinas Lisozimas Glicoproteínas Na, Ca, CL, PO4, K
Sublingual	Mucosa	Mucinas MG1 MG2 Lisozimas Na, Ca, Cl, PO4
Submandibular	Mista	Cistatinas Na, K, Ca, Cl, PO4 Amilase Cistatinas IgA Mucinas MG1
Palatinas Labiais Linguais	Mucosa	Amilase Na, K, Ca, Cl, PO4 Cistatinas IgA

## 2.2. Funções da saliva

Em resultado da diversidade de constituintes, a saliva vai apresentar múltiplas funções, entre as quais, auxílio na formação do bolo alimentar e na digestão, proteção e lubrificação da mucosa oral, ação antimicrobiana, antifúngica e antiviral, ação imunológica, capacidade tampão, controlo no processo de desmineralização/remineralização dentária, ação reparadora e curativa dos tecidos, ação antioxidante, ajuda na mastigação, na deglutição e na fonação, no paladar (com a diluição de substâncias), limpeza e hidratação da cavidade oral (Carpenter, 2013; Sala & García, 2013).

De todas estas funções que a saliva desempenha, a mais importante é a integridade do dente, a saliva protege os dentes dos ataques das bactérias e é também fundamental na formação da película adquirida. As superfícies dentárias são protegidas pela película adquirida, tanto o esmalte como a dentina subjacente ou o cimento (Dawes et al., 2015).

O esmalte é composto por cristais de hidroxiapatite que na sua composição apresentam cálcio e fosfato. A saliva por sua vez também é constituída pelos iões cálcio e fosfato, tornando-se assim o meio saturado. No entanto a película adquirida também apresenta alguma permeabilidade, o que favorece a entrada de cálcio e fosfato para as superfícies dentárias prevenindo lesões de cárie e outras patologias (Dawes et al., 2015).

A relação entre as funções da saliva e os seus constituintes e os processos em que estão envolvidos encontram-se esquematizados na figura 5.

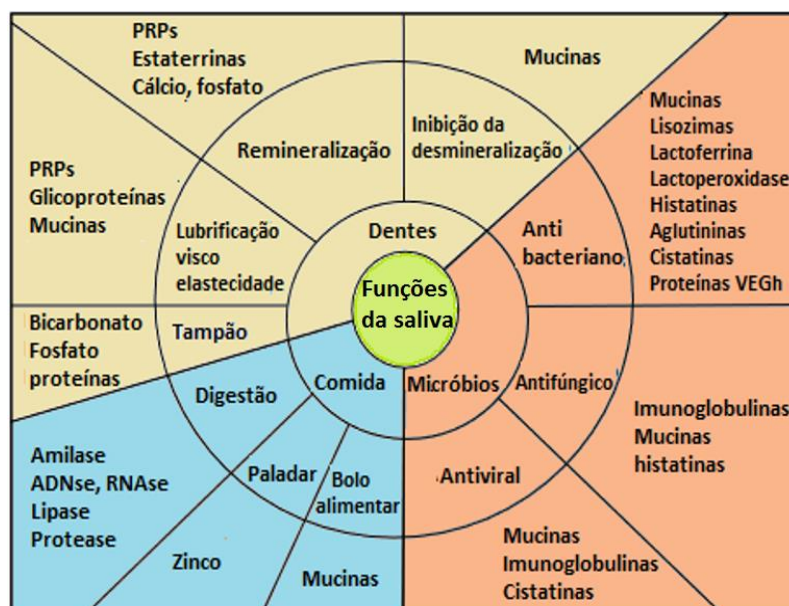


Figura 5- Funções da saliva e dos elementos que a constituem. (adaptado de van Nieuw Amerongen, Bolscher, & Veerman, 2004)

No sangue as concentrações de dióxido de carbono podem estar em níveis altos ou em níveis baixos. Devido a estas diferenças de concentrações, ou seja, quando o dióxido de carbono está presente no sangue em elevadas concentrações, este passa para a saliva tornando-a ácida. Assim baixa os valores normais do pH (entre 6 e 7,5) para um pH ácido (podendo atingir o valor de 5,3) favorável a desmineralização. Por outro lado, quando o dióxido de carbono se encontra no sangue em baixas concentrações este passa para a saliva em quantidades muito reduzidas tornando-a básica e aumentando o pH para um valor superior, podendo atingir 7,8. A saliva quando estimulada apresenta um pH de 6,5 a 6,7 e quando não estimulada apresenta um pH de 6,8 a 7,5 (Benn & Thomson; Feio & Sapeta, 2005).

Ao contrário do sangue, a saliva é de estudo mais complexo, uma vez que existe com maior variabilidade, mudando de pessoa para pessoa e na mesma pessoa, de dia para dia e ao longo do dia, e a sua constituição é dependente de vários fatores. No entanto e no seguimento de vários estudos, através da análise da saliva é permitido diagnosticar doenças da cavidade oral, bem como outras doenças (Nunes, Mussavira, & Bindhu, 2015)

### 2.3. Saliva como Método de Diagnóstico

Nos últimos anos os profissionais de saúde têm optado bastante pela utilização da saliva como meio de diagnóstico, o que tem sido bastante consensual a sua utilização uma vez que este fluído oferece bastantes vantagens para o doente pela sua fácil recolha em relação ao sangue e à urina (Nunes et al., 2015). É uma recolha muito menos invasiva feita por pessoas especializadas, e de fácil acesso a alguns pacientes com deficiências, idosos e crianças (Nunes et al., 2015). Além disso na saliva existem diferentes constituintes que vão facilitar o conhecimento por parte do profissional do estado de saúde do indivíduo, esses constituintes são chamados de biomarcadores. Tem havido um grande avanço na tentativa de cada vez mais diagnosticar precocemente patologias associadas à cavidade oral. Assim sendo estes biomarcadores salivares podem facilitar a obtenção de um diagnóstico mais precoce da doença e também conseguir meios preventivos mais eficazes (Liu & Duan, 2012; Slavish, Graham-Engeland, Smyth, & Engeland, 2015).

As pessoas que têm um menor fluxo salivar e o seu organismo produz menores quantidades de saliva são mais suscetíveis a patologias orais, nomeadamente nas estruturas dentárias (Edgar, Dawes, & O`Mullane, 2014). O decréscimo do fluxo salivar provoca múltiplas mudanças na flora oral, tais como, a diminuição da capacidade tampão da saliva, que vai provocar um acréscimo de *strptococos mutans*, *lactobacilos* e outras bactérias, ou seja, quando o fluxo salivar ou a quantidade de saliva diminui há um aumento do risco de formação de lesão de cárie dentária (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010).

### 2.4. Regulação do Fluxo Salivar

A salivação é estimulada por um bom paladar e bom cheiro aos alimentos. O fluxo salivar é regulado principalmente pelo Sistema Nervoso Autónomo (Sistema Nervoso simpático e Sistema Nervoso Parassimpático). As glândulas salivares quando estimuladas secretam saliva serosa ou saliva mucosa. Assim o Sistema nervoso simpático regula a secreção serosa e também parte da mucosa mas em muito menor quantidade, e o Sistema Nervoso Parassimpático regula a secreção mucosa (Carpenter, 2013; Chiappin et al., 2007).

## 2.5. Disfunção Salivar (Xerostomia)

É importante saber distinguir xerostomia de hipossalivação, em que a xerostomia é a sensação de boca seca devido a uma diminuição apenas quantitativa do fluxo salivar em repouso, resultando na diminuição das proteínas como as mucinas, logo diminuição da lubrificação. A hipossalivação é uma redução objetiva do fluxo salivar (Coimbra, 2015; Deng et al., 2015).

A xerostomia é uma patologia bastante comum na sociedade, abrangendo entre 5,5% e 46% da população mundial, variando com o sexo, e tendo tendência a aumentar com a idade (Villa, Connell, & Abati, 2015).

Os pacientes com xerostomia sentem alterações no paladar, desconforto na mastigação e na deglutição e dificuldade em falar. A xerostomia é a sensação de boca seca, resultado ou não da disfunção das glândulas salivares, alterando a saliva quer na sua quantidade como na sua qualidade (Villa et al., 2015).

Tem-se verificado que a xerostomia pode causar nos pacientes algum desconforto a nível psicológico e social e também a nível físico, podendo resultar em cáries dentárias, infecções fúngicas orais como a candidíase, em mau hálito e no aumento do risco de doenças periodontais. Os pacientes que usam prótese dentária começam a sentir problemas na retenção da prótese e também desconforto. A xerostomia provém de 3 causas principais: causas que modificam a estimulação autonómica, disfunção das glândulas salivares e anomalia no centro salivar. É mais prevalente em idosos, não só devido à idade mais avançada, mas também pelo maior consumo por parte do idoso de fármacos xerostomizantes (Deng et al., 2015; Villa et al., 2015).

Boca seca pode ser causada para além do uso de medicamentos xerostomizantes por outros fatores como, a radioterapia, a síndrome de *Sjögren*, e o uso de estupefacientes. Na 3ª idade o fator mais prevalente é o uso de medicamentos (Kho, 2014).

A taxa de fluxo diário normal quando em repouso é cerca de 0,3 a 0,4 ml/min e cerca de 1,5 a 2,0 ml/min quando estimulada (Villa et al., 2015). Em pacientes com xerostomia a taxa do fluxo salivar quando há estimulação é cerca de 0,4 a 0,7 ml/min, e a taxa de fluxo salivar quando não existe estimulação é inferior de 0,1 a 0,2 ml/min (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010; Villa et al., 2015)

Nos casos mais graves de xerostomia verifica-se uma diminuição da capacidade tampão da saliva o que leva a uma deficiência na quantidade de proteínas essenciais para

a manutenção do equilíbrio ecológico da cavidade oral, resultando também numa diminuição do pH. Proteínas como as mucinas MUC5B, e MUC7 vão estar em pequenas quantidades na cavidade oral (Deepa & Thirrunavukkarasu, 2010).

É também importante saber diagnosticar a xerostomia quer a nível qualitativo quer a nível quantitativo. Os sinais clínicos que revelam um diagnóstico qualitativo podem ser a não acumulação de saliva no pavimento da boca, lábios secos, saliva mais esbranquiçada, espumosa, fibrosa e pegajosa, candidíase oral, cáries, dor crónica com ardor, sensação de areia nos dentes. O diagnóstico quantitativo é feito com análises sialométricas, com medições do fluxo salivar em repouso. É muito importante a realização de um bom diagnóstico diferencial em relação a doenças infetocontagiosas que causem xerostomia, como o HIV, a Diabetes, a doença de Parkinson a Alzheimer e a fibrose cística (Coimbra, 2015; Villa et al., 2015).

Como todas as patologias, a xerostomia tem medidas de tratamento. Assim no seu tratamento inclui-se primeiramente a hidratação do dente, a redução do consumo do tabaco e do álcool e a manutenção de uma dieta controlada. É essencial uma boa higiene, uma boa escovagem, uso de clorhexidina e flúor, uso diário de estimulantes salivares como pastilhas sem açúcar e cenoura crua, ou uso de saliva artificial à base de mucinas para quando em contacto com as superfícies hidrofóbicas formarem o biofilme (Coimbra, 2015; Fávoro, Ferreira, & Martins, 2006)

### **2.5.1. Síndrome de Sjögren**

O síndrome de *Sjögren* é uma doença autoimune, crónica, que ataca tecidos saudáveis do corpo principalmente as células epiteliais das glândulas exócrinas. As glândulas mais atingidas são as lacrimais e as salivares. Os principais sintomas são olhos secos (xeroftalmia) e boca seca (xerostomia) (Liu & Duan, 2012).

Um estudo realizado por Liu & Duan (2012) mostrou que indivíduos com síndrome de Sjögren apresentam concentrações aumentadas de sódio, de cálcio, de Imunoglobulina G (IgG), de lisozima, de albumina e de metaloproteases (MMPs) da matriz na saliva secretada pela glândula parótida (Liu & Duan, 2012).

Vários estudos foram feitos durante muitos anos no sentido de encontrar biomarcadores salivares para a síndrome de Sjögren, no entanto nenhum deles foi explícito e que mostra a inexistência de biomarcadores para esta síndrome, possivelmente pelas condições em que foram realizados os estudos. A recolha da saliva é um método

fácil, no entanto pode haver outros fatores que possam influenciar a sua colheita (Liu & Duan, 2012).

### 3. Proteínas Salivares

Nos últimos anos foram encontradas variadíssimas espécies microbianas na flora da cavidade oral. Até à data são conhecidas cerca de 700 espécies, o que faz do meio oral, um meio com bastante diversidade. Os microrganismos e as proteínas presentes na saliva dão a informação sobre a composição da flora oral e portanto são ótimos biomarcadores para o diagnóstico precoce de patologias orais, bem como outras doenças sistémicas. Ao nível da placa, estudos indicam que existe uma relação entre a quantidade de *streptococos* presentes na saliva e os *streptococos* presentes na placa bacteriana (Guo & Shi, 2013; Vasudevam et al., 2011).

Uma particularidade que as proteínas salivares têm em comum é o fato de serem constituídas por polimorfismos genéticos que produzem variadas famílias de moléculas que interagem entre si. Algumas proteínas salivares apresentam isoformas desempenhando funções idênticas (Bennick, 2002).

Têm sido realizados diversos estudos nos últimos anos no sentido de identificar um número cada vez maior de proteínas salivares como biomarcadores. Vários testes e métodos foram utilizados, como a cromatografia líquida, a eletroforese em gel (para separar os componentes das proteínas), a eletroforese capilar, a ressonância magnética, a espectrometria de massa (na identificação de posteriores péptidos) e os ensaios imunológicos (RIA, IRMA, EIA, ELISA), para tentar compreender melhor a estrutura e função das proteínas salivares (Al-Tarawneh et al., 2011; Chiappin et al., 2007).

As proteínas salivares estão presentes na saliva secretada pelas glândulas salivares, essa saliva secretada difere no tipo de proteínas presentes. Assim, como proteínas de primeira linha, encontram-se as proteínas ricas em prolina (PRPs, ácidas ou básicas), as mucinas, as histatinas e as cistatinas (Vasudevam et al., 2011).

Para além da utilização da saliva como meio de diagnóstico para a cárie dentária, com a finalidade de identificar a presença do *streptococos mutans* e do *lactobacillus spp*, e do ácido láctico. A saliva também tem sido utilizada como meio de diagnóstico para outras patologias, como por exemplo identificar a presença da *candida albicans*, bactérias que indiquem doenças periodontais e ainda alterações na secreção exócrina de saliva da glândula submandibular em resultado de um aumento do sódio, cloreto, cálcio, fosfato e



lípidos. E produz IgA assim como anticorpos antigliadina, que são úteis para o diagnóstico da doença celíaca. Através da saliva é, ainda, possível diagnosticar doenças malignas por se encontrar aumentada expressão da p53 uma vez que a inativação desta proteína é uma alteração genética comumente observada no carcinoma das células escamosas orais. Na saliva é ainda possível detetar níveis elevados da proteína defensina-1, no caso do cancro da mama (marcador CA-125). A saliva possui ainda marcadores para o diagnóstico de doenças virais como a hepatite A e B que conseguem identificar os anticorpos IgA e IgM. Do mesmo modo a saliva possui ainda marcadores para diagnóstico do VIH (Llena-Puy, 2006).

A saliva é ainda utilizada para controlar as concentrações de lítio, de carbamazepina, de barbitúricos, de benzodiazepinas, de fenitoína, de teofilina e de ciclosporina. A presença de tiocianato indica os níveis de tabagismo do indivíduo. Para além disso, a saliva é utilizada para a identificação de drogas como cocaína e opiáceos (Kościelniak, Jurczak, Zygmunt, & Krzyściak, 2012; Llena-Puy, 2006).

*Tabela 5- A tabela mostra algumas das principais famílias de proteínas salivares (adaptada de Carpenter, 2013).*

Proteínas ricas em prolina (PRPs)	Cistatinas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 70% de todos os aminoácidos são de prolina, glicina, ou glutamina</li> <li>• 70% das proteínas da parótida</li> <li>• A forma básica está só presente na parótida</li> <li>• Polimórficas, i.e. grupos de proteínas formadas a partir de seis genes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ausente na saliva da parótida</li> <li>• Inibidora da cistatina proteinase</li> <li>• Formas presentes variam consoante o pH, ou ácido ou básico</li> </ul>
Mucinas	Histatinas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rica em prolina, serina, e trionina</li> <li>• MUC5B forma gel</li> <li>• Ausente na saliva da parótida</li> <li>• Altamente glicosiladas e viscosas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ricas em histidina</li> <li>• pH básico</li> <li>• Só as formas 1 e 3 estão fosforiladas</li> </ul>
Amilase	Estaterrinas
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Várias isoformas, a maioria glicosiladas</li> <li>• Mais ativa na digestão da maltose mas podem atacar muitos polissacarídeos</li> <li>• Das mais proteínas abundantes presentes na saliva</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molécula anfipática que contém ambos os domínios hidrofóbicos e hidrofílicos, altamente tensoativo</li> <li>• Grupos de fosfato favorecem a ligação ao esmalte dentário</li> <li>• Estrutura alterada em solução aquosa</li> <li>• Não glicosilada</li> </ul>

### **3.1. Biomarcador**

Biomarcador é uma biomolécula que pode indicar uma alteração no estado de saúde do indivíduo, indicando se um processo biológico é normal ou patológico (Liu & Duan, 2012).

Um Biomarcador para ser usado tem que obedecer a um conjunto de critérios, a fim de minimizar os riscos para a saúde. Assim, um Biomarcador deverá ser verificado e validado antes de aplicado, obedecendo a um conjunto de 6 pré-requisitos: testar o desenvolvimento em animais como modelos, ensaios preliminares com amostras do paciente, verificar a viabilidade, validação da precisão dos ensaios, análise estatística e relatórios de aprovação (Liu & Duan, 2012).

Na validação de um Biomarcador deve-se optar principalmente por aqueles que se encontram envolvidos na causa da doença, uma vez que são estes que darão melhor previsão e diagnóstico da patologia (Liu & Duan, 2012).

Em resultado de diversos estudos efetuados com muitas proteínas salivares, os biomarcadores dividem-se em 3 tipos: os biomarcadores que são específicos para uma patologia, os biomarcadores que não sendo específicos para uma patologia no entanto indicam uma anomalia e os biomarcadores que são identificados de forma aleatória que indicam variadíssimos resultados entre as amostras (Al-Tarawneh et al., 2011).

O proteoma salivar dá-nos a informação dos principais grupos de proteínas salivares. Os biomarcadores salivares vão ser definidos pelas pequenas proteínas ou péptidos existentes na saliva chamados de marcadores de proteômica. Estes vão possibilitar diagnósticos precoces e também a prevenção de estados de saúde (Spielmann & Wong, 2011).

### **3.2. Proteínas com Atividade Antimicrobiana**

#### **3.2.1. Glicoproteínas**

As glicoproteínas representam um dos maiores grupos de proteínas existente no ser humano. Estas são encontradas em todas as células eucariotas e possuem variadíssimas funções, tais como estrutural, lubrificante, transporte molecular, hormonal, enzimática, recetora, e anticongelante. Afetam ainda o dobramento de algumas proteínas,

regulação do crescimento proteico, e têm um papel importante para a contribuição da homeostase (Harper's illustrated biochemistry, 2012).

As glicoproteínas são constituídas por uma parte proteica e outra parte glucídica e a união entre ambas é feita com o carbono anomérico de uma ose e as cadeias laterais de serina, treonina e asparagina. A maior parte das proteínas salivares são glicoproteínas, que têm hidratos de carbono ligados ao seu núcleo proteico (Nauntoft et al., 2005; Quintas, Freire, & Halpern, 2008).

A parte glucídica das glicoproteínas é de extrema importância uma vez que esta dá-nos informação sobre a estrutura molecular das glicoproteínas. No exterior das membranas as glicoproteínas desempenham funções importantes uma vez que são necessárias para o reconhecimento celular e têm um papel preponderante na adesão dos tecidos (Quintas et al., 2008).

As células do sistema imunitário utilizam as glicoproteínas do exterior das membranas como fatores de diferenciação com o objetivo de reconhecer quais as células que fazem parte do organismo e as que não fazem (Quintas et al., 2008).

### **3.2.1.1. Mucinas**

As secreções mucosas são muito importantes para regular a saúde oral uma vez que estas traduzem a diversidade microbiana que se encontra na cavidade oral, para além de que revestem todas as estruturas. Qualquer deficiência na sua composição e produção poderá comprometer a saúde oral. O muco é bastante viscoelástico e isso deve-se à presença das mucinas. O muco é constituído principalmente por glicoproteínas, que também são chamadas de mucinas de formação de gel (Perez-vilar, 2007).

As mucinas representam uma das maiores famílias de glicoproteínas mucosas existentes na saliva, aparecendo em duas formas, MG1 e MG2, sendo que estes são os dois grandes grupos de mucinas. Estas proteínas são constituídas por sulfato, ácido siálico e contêm grupos carregados negativamente exercendo várias funções na cavidade oral tais como, revestimento dos tecidos, lubrificação e capacidade de se ligarem às bactérias. As mucinas são consideradas as proteínas mais importantes no revestimento dos tecidos da cavidade oral (Bielawski, 2014; Dawes et al., 2015; Quinn, Simone, Braxton, & Louis, 2013).

As mucinas são secretadas pelas glândulas sublinguais (70%) e pelas glândulas submandibulares, labiais e palatinas (30%). Estas proteínas são constituídas por uma parte

proteica (apomucina) e por uma parte glucídica (HC). Como todas as proteínas salivares referenciadas, também as mucinas têm uma forte relação com a cárie dentária. O seu bom entendimento pode vir a ser uma boa ferramenta para um diagnóstico precoce e, até mesmo, para prevenção da cárie dentária. As mucinas presentes na saliva são expressas por seis genes (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5BAC, MUC5B, e MUC7) (Frenkel & Ribbeck, 2015; Quinn et al., 2013).

Os dois principais grupos de mucinas são expressas pelos genes MUC5B (gene para a MG1) e MUC7 (gene para a MG2). As MG1 e MG2 são altamente viscosas, lubrificam as superfícies dentárias, têm bastante importância durante a mastigação, a fala e a deglutição, principalmente em indivíduos que tenham baixo fluxo salivar (Dawes et al., 2015).

As mucinas MG1 são as primeiras a aderir à película adquirida e interagem com o *streptococos mutans* reduzindo a sua ação, podendo-se afirmar que a MG1 apresenta um mecanismo de ação antimicrobiana e uma estrutura bastante variada que outras proteínas salivares não possuem. Neste sentido pode-se dizer que existe uma relação direta entre a MG1 e a cárie dentária (Frenkel & Ribbeck, 2014).

Um estudo realizado por (Frenkel & Ribbeck, 2014) mostrou que o *streptococos mutans* em presença de sacarose tem uma ação muito mais eficaz, no entanto com a adição de uma MUC5B purificada esta mostrou ter uma ação sobre o *streptococos mutans* impedindo a sua adesão ao biofilme. Estes autores concluíram que esta diminuição da adesão do *streptococos mutans* ao biofilme é resultado de uma combinação de alterações genéticas, sendo que a presença ou a ausência da MUC5B vai alterar a relação de suscetibilidade do indivíduo à cárie dentária, podendo ser um ótimo marcador de diagnóstico clínico para a esta doença. No entanto mais estudos genéticos terão que ser realizados no sentido de entender melhor todo este mecanismo (Frenkel & Ribbeck, 2014).

Existem estudos que conseguiram provar a importância da MG1 na prevenção de patologias orais, podendo-se dizer que a MG1 na presença do *streptococos mutans* não vai impedir o crescimento deste, mas sim mantê-lo na sua forma primária, inibindo a sua ligação ao biofilme e, deste modo a evitar a sua ação desmineralizante sobre as superfícies dentárias (Frenkel & Ribbeck, 2014, 2015).

Em relação à MG2, esta não é menos importante, uma vez que estudos feitos nos últimos anos relatam que os níveis diminuídos de MG2 em presença significativa do *streptococos mutans* é indicador de alto risco de cárie dentária, pois esta proteína na

região N-terminal contém um domínio de ligação a esta bactéria, inibindo a sua ação (Guo & Shi, 2013; Quinn et al., 2013).

Segundo o estudo realizado por Al-Tarawneh et al. (2011) verificou-se que existe uma possível associação entre a cárie dentária e a concentração de mucinas na saliva, especialmente os genes MUC1 e MUC5B

### **3.2.1.2. Proteínas Ricas em Prolina (PRPs)**

Grande parte da saliva produzida pelas glândulas parótidas e submandibulares é composta por um grupo de proteínas que têm a capacidade de se ligar aos taninos, denominadas de PRPs (Carpenter, 2013; Levine, 2011). Os taninos são compostos polifenóis que apresentam a capacidade de precipitar as proteínas salivares. As PRPs são importantes para a formação da película adquirida, uma vez que reduzem a carga bacteriana, o que retarda a perda de cálcio e fosfato por parte do dente (Vasudevam et al., 2011).

As PRPs foram as primeiras proteínas a serem encontradas na saliva humana, sendo purificadas e identificadas. A sua denominação deve-se ao facto de serem ricas no aminoácido prolina, sendo que este corresponde a aproximadamente 25 a 42% dos aminoácidos das PRPs. Para além deste aminoácido, estas proteínas contêm um elevado conteúdo em glutamina e em glicina. A saliva é supersaturada em cálcio e fosfato, sendo que as PRPs assim como as estaterinas, as histidinas e as cistatinas são proteínas que têm a capacidade de se unir à hidroxiapatite impedindo que haja precipitação excessiva do cálcio e do fosfato evitando deste modo uma proliferação excessiva dos cristais de hidroxiapatite (Nauntoft et al., 2005; Sala & García, 2013).

As PRPs podem-se classificar em duas classes, as PRPs ácidas e as PRPs básicas, em que as PRP básicas se dividem em PRPs glicosiladas e PRPs não glicosiladas, sendo esta classificação atribuída devido à existência/ausência de polissacáridos na sua constituição (Levine, 2011).

Funcionalmente, as PRPs glicosiladas têm propriedades lubrificantes ajudando na proteção dos tecidos orais contra as forças abrasivas durante a mastigação e a fala, sendo função comum a outras proteínas salivares glicosiladas. Para além disso, pensa-se que estas proteínas também são provenientes de um gene relacionado com a suscetibilidade à cárie dentária (Levine, 2011). Contudo, esta propriedade é afetada pelo tipo de hidratos de carbono, bem como pela extensão da glicosilação. Estas proteínas têm ação

antibacteriana uma vez que se podem ligar às bactérias na cavidade oral. Certos polimorfismos das PRPs básicas têm função antibacteriana uma vez que têm capacidade de neutralizar os ácidos libertados pelas bactérias (Sala & García, 2013; Triana et al., 2012).

As PRPS ácidas representam cerca de 30% de todas as proteínas da saliva e estão fortemente ligadas ao esmalte dentário pelo seu domínio N-terminal com aminoácidos ricos em resíduos de glutamato e aspartato, sendo que os genes que as codificam são o PRH1 e o PRH2. No domínio C-terminal, as PRPs apresentam um local de união para as bactérias, conseguindo deste modo ter um papel fundamental na colonização da placa bacteriana. Estas proteínas conseguem unir-se aos iões cálcio e deste modo favorecer a remineralização dentária (Triana et al., 2012). O domínio N-terminal das PRPs ácidas possui um local onde os principais grupos de bactérias (como o *streptococos viridans* e *actinomyces spp*) se vão ligar (Levin, 2011).

Em relação às PRPs básicas, estas apresentam no seu domínio N-terminal resíduos de lisina, arginina e histidina e são codificadas pelos genes PRB1, PRB2, PRB4 e PRB5 (Levin, 2011).

As PRPs tal como todas as proteínas salivares alteram-se com a idade, sendo que estudos recentes mostraram níveis altos de PRPs e proteína S100 em bebés prematuros e níveis baixos em bebés nascidos após as 40 semanas de gestação. Na substituição dos dentes decíduos pelos dentes permanentes, em crianças com idades entre os 6 e os 9 anos observou-se uma queda nos níveis das PRPs ácidas e da proteína S100. Os níveis elevados destas duas proteínas em bebés prematuros deve-se à falta de transglutaminase epitelial (Kościelniak et al., 2012).

Segundo o estudo de Zakhary e colaboradores observou-se uma relação entre os genes que expressam as correspondentes PRPs e a suscetibilidade à cárie dentária (Zakhary et al., 2007). Outros estudos independentes evidenciam uma associação entre as proteínas ricas em prolina e a suscetibilidade à cárie dentária (Levine, 2011).

### 3.2.1.3. Defensinas

As defensinas são péptidos catiónicos que desempenham diversas funções no organismo humano. Além da sua ação antimicrobiana (devido a sua carga catiónica), as defensinas apresentam ainda ação antiviral e antifúngica. As defensinas dividem-se em duas famílias, as  $\alpha$ -defensinas (HNP1, HNP2, HNP3, HNP4) formadas pelos granulócitos

e linfócitos e as  $\beta$ -defensinas (hBD1, hBD2, hBD3, hBD4) formadas pelas células da mucosa. A sua ação antimicrobiana resulta da ligação às membranas das bactérias abrindo os poros e os canais iônicos levando a rotura da membrana das bactérias. A atividade antifúngica é característica, principalmente, das  $\beta$ -defensinas uma vez que estas se ligam aos fungos (por exemplo a *candida albicans*), através de proteínas do tipo HSP70. As defensinas têm ainda a capacidade de agir no sistema imunitário através da ativação de determinadas citocinas (T. Fábíán, Gótai, Beck, Fábíán, & Fejérdy, 2009; Tibor Fábíán, Hermann, Beck, Fejérdy, & Fábíán, 2012).

As proteínas do tipo HSP70/HSPA encontram-se na maioria dos tecidos, no sangue, nos fluidos sinoviais e na saliva, apresentam ainda propriedades citoprotetoras, pela libertação de citocinas. Estas proteínas entram na corrente sanguínea e conseguem atuar em diversas partes do corpo. Na cavidade oral as proteínas HSP70/HSPAs revestem todo o dente uma vez que têm capacidade de se ligar à hidroxiapatite. Estas proteínas também se vão aglutinar não só as bactérias gram-positivas, como por exemplo o *streptococos mutans* e o *streptococos mitis*, mas também às gram-negativas como a *escherichia coli*, fazendo assim parte da película adquirida e podendo desta forma eliminar as bactérias prejudiciais não só para o dente, mas também a outros locais do organismo (T. Fábíán et al., 2009; Tibor Fábíán et al., 2012).

Um estudo realizado por Fujimoto em 2011 revelou que após o exercício físico as concentrações de  $\beta$ -defensinas<sup>2</sup> e de IL-37 aumentam significativamente quando são libertadas citocinas pró-inflamatórias como IL-1b ou TNF-  $\alpha$  que provocam a libertação de proteínas antibacterianas (Tibor Fábíán et al., 2012).

#### 3.2.1.4. Aglutininas

As aglutininas são um grupo de glicoproteínas presentes na saliva que se vão ligar às bactérias agrupando-as de maneira que seja mais fácil para a saliva inibir as suas ações (Levin, 2011). Estas proteínas são fortemente glicosiladas e têm a capacidade de se unir à película adquirida e a microrganismos bacterianos como o *streptococos mutans* e o *streptococos sanguinis*, inibindo a sua ação (Triana et al., 2012).

### 3.2.1.5. Lactoferrina

A lactoferrina é uma glicoproteína catiónica originária das glândulas salivares parótidas e do fluido gengival e apresenta ação bacteriostática contra bactérias, vírus, fungos, parasitas uma vez que lhes retira o ferro que necessitam para o seu metabolismo. Tem a particularidade de possuir carga positiva, o que lhe confere capacidade de romper as membranas celulares microbianas (Tibor Fábíán et al., 2012). Existem 3 isoformas da lactoferrina, a  $\alpha$ -lactoferrina, a  $\beta$ -lactoferrina e a  $\gamma$ -lactoferrina. A  $\alpha$ -lactoferrina tem atividade ribonuclease, liga-se ao ferro e suporta um pH de 4 a 4,5, por outro lado, a  $\beta$ -lactoferrina e a  $\gamma$ -lactoferrina não se ligam ao ferro mas apresentam atividade ribonuclease. A lactoferrina apresenta ação bacteriostática, inibindo a proliferação de bactérias como da *E. coli*, a qual necessita de ferro para o seu crescimento e ação bactericida uma vez que na região N-terminal têm recetores que se ligam à parede celular das bactérias gram-negativas eliminando-as (Quinn et al., 2013).

A lactoferrina possui também atividade bactericida durante a digestão no trato gastrointestinal em que esta liberta um domínio antimicrobiano, indicando atividade bactericida para além da cavidade oral. Além destas funções, a lactoferrina apresenta um papel importante na modulação da resposta inflamatória (Triana et al., 2012).

Vitorino e colaboradores observaram a existência de uma possível relação entre os níveis de lactoferrina e a suscetibilidade dos indivíduos à cárie dentária (Vitorino et al., 2006). Adicionalmente, para avaliar o poder inibitório da lactoferrina sobre o *streptococcus mutans*, o *streptococcus sobrinus* e o *lactobacillus acidophilus*.

Tonguc-Altin e colaboradores realizaram um estudo com esta proteína, concluindo que a lactoferrina mostra uma forte ação inibitória sobre estas bactérias (Tonguc-Altin et al., 2015).

Para além destes, num outro estudo realizado por Brancher e colaboradores, estes verificaram que a lactoferrina tem relação com a cárie dentária (Brancher et al., 2011).

### 3.2.1.6. Imunoglobulinas

As imunoglobulinas são um grupo de glicoproteínas segregadas pelas células do sistema imunitário. Na saliva encontra-se em maior número a IgA, considerada a imunoglobulina mais importante. Esta é produzida nas glândulas salivares e apresenta função antiviral, antibacteriana, impede a adesão e o crescimento das bactérias ligando-



se a recetores destas e tem um papel fundamental na prevenção da cárie dentária (Triana et al., 2012).

As IgGs, IgMs e IgAs têm uma função determinante na proteção dos dentes e da mucosa oral contra a ação das bactérias, sendo que as IgGs e as IgMs provêm do fluído crevicular e têm principal ação no *streptococos mutans* e no *bacterioides gengivalis*. Por outro lado as IgAs são muito resistentes à ação das enzimas proteolíticas da saliva uma vez que são segregadas sob a forma dimérica pelas glândulas salivares (A. Almeida, 2007; Chawda, Chaduvula, Patel, Jain, & Lala, 2011; Triana et al., 2012).

### **IgA e a Cárie Dentária**

Nos últimos anos tem-se realizado estudos para compreender melhor o papel de certas proteínas no desenrolar da cárie dentária, e as imunoglobulinas não fogem à regra. A IgA é considerada a principal desta família de proteínas e é a mais importante nos processos de defesa na cavidade oral (Chawda et al., 2011).

Juntamente com outros compostos de ação antimicrobiana como as lisozimas, lactoferrinas, peroxidase salivar e as mucinas, as IgAs vão impedir que as bactérias se liguem à película. Um nível baixo de IgAs no organismo pode trazer problemas quer a nível respiratório, quer a nível periodontal e também um comprometimento na proteção das estruturas dentárias (Chawda et al., 2011).

Em indivíduos fumadores e suscetíveis à cárie dentária encontram-se baixos níveis de IgA na saliva. Pode-se dizer que o tabaco influencia a presença de IgAs na saliva (Hagh, Zakavi, Ansarifard, Ghasemzadeh, & Solgi, 2013).

Segundo Lihong Guo & Wenyuan Shi (2013), as concentrações de IgAs na saliva têm uma função exclusiva no seu combate à cárie dentária. Estes investigadores também descreveram que existe uma relação entre a cárie dentária e as concentrações de lisozimas, mucinas, cistatinas, lactoferrina e albumina secretadas pelas glândulas salivares sublinguais e submandibulares (Guo & Shi, 2013).

Segundo o estudo de Gornowicz et al. (2014) verificou-se a existência de uma associação entre o aumento da concentração de IgA na saliva e a cárie dentária. Adicionalmente, no estudo realizado por Vitorino e colaboradores confirmaram os resultados obtidos por Gornowicz et al. (2014) (Vitorino et al., 2006).

Um outro estudo com o objetivo de encontrar relação entre os níveis de IgA na saliva de crianças com suscetibilidade para a cárie dentária, mostrou que existe um

aumento dos níveis desta imunoglobulina em presença do *streptococos mutans* (Ranadheer, Nayak, Reddy, & Rao, 2011). No entanto outros autores partilham de opinião diferente, sendo necessário uma pesquisa mais ampla nesta área no sentido de encontrar resultados que provem este estudo

De há alguns anos para cá que se tem vindo a estudar as IgAs e a sua relação com a cárie dentária. No entanto, tem havido grande discórdia em relação aos resultados que os vários autores apresentam. Deverá existir um melhor entendimento e esclarecimento da relação que existe entre a IgA e a cárie dentária (Luc, Ospina-cata, Arango-rinc, & Mar, 2013).

### **3.2.2. Cistatinas**

As cistatinas são proteínas que pertencem à família de algumas fosfoproteínas compostas por cisteína. Existem 9 isoformas de cistatinas: cistatina neutra, 3 isoformas de cistatina ácida, 3 isoformas de cistatina S (mais aniónica), 1 isoforma de cistatina C (catiónica), e 1 isoforma de cistatina D. Estas proteínas intervêm na ação das cisteinilproteases, evitando o crescimento bacteriano e a sua ação patogénica (Triana et al., 2012).

Um estudo realizado por Vitorino e colaboradores, em que utilizou dois grupos de indivíduos, um grupo era suscetível à cárie e o outro livre de cáries. Concluíram que existe uma considerável relação entre a presença das cistatinas no grupo suscetível à cárie dentária, ou seja, na saliva destes indivíduos as cistatinas existem em menor quantidade (Vitorino et al., 2006).

Adicionalmente, Zakhary e colaboradores efetuaram um estudo com proteínas cistatinas que mostrou a existência de uma relação direta entre a elevada concentração destas proteínas e a ausência de cárie dentária (Zakhary et al., 2007).

Rudney e colaboradores também mostraram a existência de uma relação entre as baixas concentrações de cistatina e o risco de cárie dentária (Rudney, Staokov, & Johnson, 2009).

### 3.2.3. Histatinas

As histatinas são um grupo de péptidos antimicrobianos relacionados estruturalmente, ricas em aminoácidos como, a arginina, a histidina e a lisina, sendo secretadas pelas glândulas salivares parótida e submandibular. São proteínas que a pH fisiológico apresentam carga positiva (catiônicos). Atualmente são conhecidas cerca de 12 tipos de histatinas na saliva, a maioria das quais se forma pela degradação de duas moléculas originárias, a histatina 1 e a histatina 3 (Amerongen & Veerman, 2002).

Por exemplo, a histatina 5 forma-se a partir da histatina 3 e tem um papel importante na formação da película adquirida, na eliminação de substâncias nocivas, na quelatação de íons metálicos, no bloqueio de citoquinas inflamatórias e no bloqueio de enzimas proteolíticas. Na mudança dos dentes decíduos para permanentes as histatinas 1 têm um papel importante na cicatrização dos tecidos. Pensa-se que a ação bactericida das histatinas deve-se a formação de poros nas membranas das bactérias (Amerongen & Veerman, 2002; McDonald, Goldberg, Tabbara, Mendes, & Siqueira, 2011).

Um estudo realizado por Flagfeldt et al. (2009) no sentido de provar o poder antifúngico da histatina-5 sobre a *candida albicans*, mostrou que esta proteína inibe a colonização deste fungo nas estruturas dentárias (Vukosavljevic et al., 2012). Adicionalmente, segundo o estudo realizado por Gornowicz et al. (2014) verificou-se que existe uma associação entre o aumento da concentração de histatina-5 na saliva com a suscetibilidade à cárie dentária.

### 3.2.4. Lisozimas

As lisozimas são proteínas catiônicas de baixo peso molecular com ação catalítica e o seu papel antimicrobiano deve-se ao fato de catalizarem a hidrólise de polissacarídeos da parede celular bacteriana. Apresentam também ação bactericida enzimática uma vez que ativam as autolisinas bacterianas (Fine, 2015) e a capacidade de se ligarem à hidroxiapatite, o que traduz a função antimicrobiana das lisozimas (Quinn et al., 2013)

As lisozimas têm ação principalmente sobre as bactérias gram-positivas, sendo que as gram-negativas também são alvo destas mas em menor percentagem, bem como os fungos. Têm ação antiviral, e ligam-se a um polissacarídeo bacteriano que é uma toxina inibindo a sua ação. (Tibor Fábíán et al., 2012).

As lisozimas podem também provocar a lise bacteriana, principalmente do *streptococos mutans* e protegem a cavidade oral da ação da *candida albicans*. As lisozimas tem principalmente ação bactericida e bacteriostática para com as bactérias, no entanto, a ação da lisozima na cavidade oral ainda requer mais estudos no sentido de conhecer corretamente todas as suas funções (Andrade et al., 2014).

Não é unânime entre a comunidade científica que o *streptococos mutans* e o *streptococos l. Casei* sejam unicamente inibidos pela lisozima e não pela lactoferrina nem pela combinação de ambas (Andrade et al., 2014).

Um estudo realizado por Samaranayake e colaboradores mostrou que a proteína lisozima mesmo em baixas concentrações na saliva é capaz de dificultar a colonização da *candida albicans* nas estruturas dentárias. Este estudo mostrou ainda que a *candida albicans* quando em combinação com outros compostos como a nistatina, a anfotericina-b e o cetecozanol aumenta o seu poder de ação face à sua ação isolada (Samaranayake et al., 2009).

### 3.2.5. Peroxidase Salivar

A peroxidase salivar é uma proteína com peso molecular de 73-78 kDa, tem atividade enzimática e catalisa a síntese de compostos bactericidas como o hipotiocianato ( $\text{OSCN}^-$ ) e o ácido hipotiocianoso ( $\text{HOSCN}^-$ ) a partir da reação do peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) com o tiocianato ( $\text{SCN}^-$ ). Estes compostos vão interagir com os grupos sulfidrílos das enzimas bacterianas e inibir a sua ação na produção de ácidos. Desta forma, a principal função da peroxidase salivar é eliminar todo o peróxido de hidrogénio formado pelas bactérias (tóxico para as células humanas) e sintetizar o hipotiocianato (bactericida). Estas enzimas tem também a capacidade de inibir a formação de polissacarídeos extracelulares, que são responsáveis pela forte união das bactérias à película adquirida (Triana et al., 2012).

### 3.2.6. Estaterinas

A Estaterina é uma proteína de dimensões reduzidas, possui 43 resíduos de aminoácidos, é constituída por um segmento N-terminal carregado negativamente que se liga ao cálcio. Uma das principais características das estaterinas é a capacidade que apresentam em inibir a precipitação espontânea dos sais de cálcio nas superfícies

dentárias, mantendo a saliva supersaturada em cálcio evitando o depósito de minerais nos dentes, contribuindo deste modo para a hemóstase. Têm também capacidade de se ligarem ao dente participando na formação da película adquirida e de se ligar às bactérias tendo um importante papel na colonização bacteriana (Triana et al., 2012).

### 3.2.8. $\alpha$ -amilase

A  $\alpha$ -amilase é uma proteína com ação enzimática cuja principal função é a degradação do amido e do glicogénio provenientes da dieta. Esta enzima atua quebrando as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,4 do amido e do glicogénio tendo como produtos finais da digestão maltose, maltotriose e  $\alpha$ -dextrinas-limite (Ochai et al., 2014). Como a  $\alpha$ -amilase salivar é inibida em meio ácido a sua ação limita-se à cavidade oral (pH ótimo da enzima é entre 5,6 e 6,9), não ocorrendo no estômago onde o pH varia entre 1,5 e 2,5. A amilase pancreática completa a transformação do amido no intestino uma vez que aqui o pH aumenta para um valor de aproximadamente 7,0 (Nauntoft et al., 2005; Quinn et al., 2013).

Esta enzima tem também grande afinidade para os cristais de hidroxiapatite, tendo a função de remodelação da flora oral. Participa na formação da película adquirida, sendo dos componentes principais, e na lubrificação das superfícies dentárias. Na cavidade oral a quantidade de bactérias e enzimas bacterianas que sofrem a ação da  $\alpha$ -amilase salivar na superfície do dente indica que a atividade desta enzima tem uma relação com o início da cárie dentária (Ochai et al., 2014). Especialmente, a alfa amílase salivar tem uma ação inibitória sobre o metabolismo da *porphyromonas gingivalis* (Ochiai et al., 2014).

Vitorino e colaboradores num estudo paralelo com as cistatinas, em que também utilizou dois grupos de indivíduos, sendo que um grupo apresentava suscetibilidade à cárie e o outro grupo não, concluíram que existe uma relação entre as concentrações altas da  $\alpha$ -amilase e o grupo suscetível à cárie dentária (Vitorino et al., 2006).

Mais tarde, um estudo realizado por Furlan e colaboradores mostraram que existe uma relação direta entre os níveis de  $\alpha$ -amilase na saliva e a frequência cardíaca. Desta forma, este autor mostrou que esta proteína pode ter um papel muito importante no diagnóstico prévio de situações de *stress*, o que será favorável para o médico dentista na gestão de pacientes que têm receio dos tratamentos dentários (Furlan, Gaviao, Barbosa, Nicolau, & Castelo, 2012).

### **3.2.9. Lipase lingual**

A lipase lingual é uma proteína com atividade enzimática, presente na saliva secretada pelas glândulas serosas de Van Ebner e é muito importante para o conteúdo gástrico dos indivíduos com fibrose cística. A lipase gástrica é mais ativa que a lipase lingual, sendo a lipase lingual mais importante no início da digestão pois facilita a formação do bolo alimentar que está do mesmo modo revestido por uma camada fina de mucinas que facilitam a deglutição (Dawes et al., 2015). O pH ótimo para a lipase lingual é aproximadamente 7. A atividade lipase continua no estômago pela lipase gástrica, onde o pH atinge valores ácidos. Por outro lado o pH ótimo da lipase pancreática é cerca de 8 e finaliza a hidrólise dos lípidos, permitindo a sua absorção no intestino delgado (Quinn et al., 2013).

### **3.2.10. Metaloproteases (MMPs)**

As metaloproteases são proteínas que desempenham uma função importante no processo de cárie dentária e dividem-se em collagenases, gelatinases, estromelina, matrilisinas, entre outras. Estas são ativadas e resistem ao pH ácido conseguindo decompor a dentina que foi cariada durante o processo da desmineralização (Chaussain-Miller, Fioretti, Goldberg, & Menashi, 2006; Loreto, Galanti, Musumeci, Rusu, & Leonardi, 2014).

Além de destruírem os resíduos desmineralizados, as MMPs também vão entrar no processo de construção de uma nova matriz (Loreto et al., 2014).

As MMPs são encontradas nos odontoblastos e na dentina, sendo produzidas durante a primeira etapa da dentinogênese. Estas vão sendo libertadas durante o processo de evolução de cárie dentária, degradando a maior parte do colagénio resultante da desmineralização da dentina (Chaussain-Miller et al., 2006; Larmas & Sándor, 2014).

As MMPs 2, 8, 9 e 20 são encontradas na saliva, nomeadamente as collagenases (MMP8) e as gelatinases, que têm origem no fluído crevicular, vão rapidamente entrar na zona da dentina desmineralizada diminuindo o processo de cárie dentária e ao mesmo tempo participar na remineralização (Shimada, Ichinose, Sadr, Burrow, & Tagami, 2009).

A MMP3 têm um papel fundamental na proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais levando à angiogênese (crescimento dos vasos sanguíneos), sendo responsáveis pelo funcionamento deste processo. Também apresentam ação sobre a polpa

lesada pois têm forte ação cicatrizante e são encontradas também nas células regenerativas do endométrio (Zheng et al., 2009).

Para além das MMPs já referidas, atualmente são conhecidas mais de 20 formas destas proteínas. Na tabela 6 estão representadas as famílias das MMPs.

Tabela 6- Diferentes famílias de Metaloproteases (adaptado de Navarro, Nelson-Filho, Silva & Freitas, 2006)

Enzima	Número	Substrato específico
Intersticial		Colagénio helicoidal Pro MMP-2
Colagenase	MMP-1	Pro MMP-9
Colagenase-3	MMP-13	Colagénio helicoidal
Neutrófil colagenase	MMP-8	Colagénio helicoidal
Gelatinase A	MMP-2	Pro MMP-9, fibronectina
Gelatinase B	MMP-9	Gelatina, fibronectina, elastina, colagénio IV, V, VII, X e colagénio tipo 1 desnaturado
Estromelisinina-1	MMP-3	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicana, colagénio VI, V, IX, X, pro MMPs-1, 7, 8, 9, 13
Estromelisinina-2	MMP-10	Fibronectina, laminina, elastina, proteoglicana, colagénio IV, V, IX, X
MT1-MMP	MMP-14	Pro MMP-2, 13, colagénio helicoidal
MT2-MMP	MMP-15	
MT3-MMP	MMP-16	Pro MMP-2
MT4-MMP	MMP-17	
Matrilisinina	MMP-7	Fibronectina, elastina, colagénio IV
Metaloelastase	MMP-12	Elastina
Enamelisinina	MMP-20	Matriz do esmalte dentário

As colagenases, principalmente as MMP8 e as MMP13 são enzimas que degradam todo o colagénio proveniente da desmineralização, sendo importantíssimas no diagnóstico de várias patologias orais principalmente a nível do periodonto. Estas podem traduzir alterações da quantidade e qualidade no fluido oral, sendo excelentes biomarcadores para a saúde oral (Perez-vilar, 2007).

Um estudo realizado por Loreto e colaboradores mostrou que as MMPs têm ligação à cárie dentária, no entanto, segundo este autor serão necessários mais estudos com a finalidade de esclarecer melhor a ação destas proteínas no complexo polpa-dentina, em patologias da polpa, e na cárie dentária (Loreto et al., 2014).

As proteínas salivares e a variação dos seus níveis em diferentes estados fisiológicos ou patológicos encontram-se resumidas na tabela 7.

Tabela 7- Proteínas salivares e suas concentrações no estado fisiológico/patológico (adaptado de Kościelniak et al., 2012)

Fisiológico/Patológico	Proteína	Nível
Exercício físico	$\alpha$ -defensinas e $\beta$ -defensinas LL-37 HNP 1-3	$\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$
Crianças prematuras	SPRR	$\uparrow$
Crianças	S100	$\uparrow$
	Cistatinas	$\uparrow$
	PRP	$\uparrow$
Maturação	PRP	$\uparrow$
Dos 3-5 anos	Histatina 1	$\uparrow$
Fumador	IL- 8 $\beta$ - defensinas	$\uparrow$ $\downarrow$
Diabetes tipo 1	Histatina- 1 $\alpha$ - defensina 1, 2, 3 S100A9 PC Histatina 1-3 Estaterrinas PB	$\uparrow/\downarrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ $\downarrow$ $\downarrow$ $\downarrow$
Síndrome Hiper-IgE	IgE $\beta$ - defensina 2 Histatina 1	$\uparrow$ $\downarrow$ $\downarrow$
Síndrome de Sjögren`s	$\beta$ - defensina 2 $\beta$ - defensina 1	$\downarrow\downarrow$ $\downarrow$
Cárie	Estaterrinas Histatina 1 PRP 1 PRP3 Histatina 5 IL-6 Quimiocinas PGE2	$\downarrow$ $\downarrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ $\downarrow$ $\uparrow$ $\uparrow$ $\uparrow$



### III. CONCLUSÃO

Após esta revisão sistemática conclui-se que as proteínas salivares apresentam relação com a cárie dentária, pois desempenham funções na cavidade oral que as qualificam como sendo essenciais para a manutenção da saúde oral. Nesta revisão foi importante verificar diferentes funções para as diferentes proteínas salivares, bem como todos os mecanismos em que estão envolvidas. Conclui-se que a maioria das proteínas presentes na saliva apresentam funções na cavidade oral como, lubrificação de todas as superfícies, proteção das mucosas, na digestão, participam na formação da película adquirida, têm forte capacidade de se ligar às membranas das bactérias e de inibir a sua ação ou destruí-las. Além disso verificou-se que as proteínas salivares são uma ótima ferramenta de diagnóstico na detecção de patologias orais bem como de outras doenças sistêmicas.

Apesar de existirem na literatura diversos estudos que demonstraram a relação entre as diversas proteínas salivares e a suscetibilidade à cárie dentária, conclui-se que serão necessários mais estudos no sentido de caracterizar de uma forma mais completa a interação das proteínas salivares como possíveis biomarcadores para a suscetibilidade à cárie dentária.

Assim, e no seguimento desta revisão conclui-se que:

- As proteínas ricas em prolina (PRPs), a lactoferrina, as IgAs, as cistatinas, as histatinas, a lactoperoxidase, a  $\alpha$ -amilase, as metaloproteases (MMPs), as mucinas, e as lisozimas apresentam relação com a suscetibilidade à cárie dentária;
- As proteínas, defensinas, as aglutininas, a peroxidase salivar, as estaterrinas, e a lipase lingual, apesar de desempenharem funções importantes na cavidade oral bem como na prevenção da cárie dentária, não foram encontrados estudos que provassem uma relação direta de suscetibilidade à cárie dentária por parte destas proteínas.



#### IV. **BIBLIOGRAFIA**

Almeida, A. (2007). Glândulas Salivares Humanas. (lidel, Ed.).

Almeida, P., Grégio, A., Machado, M., Lima, A., & Azevedo, L. (2008). Saliva composition and functions: A comprehensive review. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 9(3), 072–080. <http://doi.org/1526-3711-497> [pii]

Al-Tarawneh, S., Border, M., Dibble, C., & Bencharit, S. (2011). Defining salivary biomarkers using mass spectrometry-based proteomics: a systematic review. *Omics: A Journal of Integrative Biology*, 15(6), 353–361. <http://doi.org/10.1089/omi.2010.0134>

Amerongen, A., Bolscher, J., & Veerman, E. (2004). Salivary Proteins: Protective and Diagnostic Value in Cariology? *Caries Research*, 38(3), 247–253. <http://doi.org/10.1159/000077762>

Amerongen, A., & Veerman, E. (2002). Saliva--the defender of the oral cavity. *Oral Diseases*, 8(1), 12–22. <http://doi.org/10.1034/j.1601-0825.2002.1o816.x>

Andrade, F., Oliveira, J., Yoshie, M., Guimarães, B., Gonçalves, R., & Schwarcz, W. (2014). Antimicrobial Activity and Synergism of Lactoferrin and Lysozyme Against Cariogenic Microorganisms. *Brazilian Dental Journal*, 25(2), 165–169. <http://doi.org/10.1590/0103-6440201302257>

Been, A., & Thomson, W. (2014). Report Saliva: An Overview. *New Zealand Dental Journal*, (February), 92–96.

Bennick, A. (2002). I Nteraction of P Lant P Olyphenols. *Crit Rev Oral Med*, 13(2), 184–196. <http://doi.org/10.1177/154411130201300208>

Bielawski, K. (2014). Mucin levels in saliva of adolescents with dental caries. *Medical Science Monitor*, 20, 72–77. <http://doi.org/10.12659/MSM.889718>

Brancher, J., Pecharki, G., Doetzer, A., Medeiros, K., Jnior, C., Sotomaior, V., ... Trevilatto, P. (2011). Analysis of polymorphisms in the lactotransferrin gene promoter and dental caries. *International Journal of Dentistry*, 2011, 9. <http://doi.org/10.1155/2011/571726>

Cárdenas, M., Elofsson, U., & Lindh, L. (2007). Salivary mucin MUC5B could be an important component of in vitro pellicles of human saliva: An in situ ellipsometry and atomic force microscopy study. *Biomacromolecules*, 8, 1149–1156. <http://doi.org/10.1021/bm061055h>

Carpenter, G. (2013). The Secretion, Components, and Properties of Saliva. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 267–276. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182700>

Carvalho, J., Godoy, L., & Bastos, M. (2002). Comparação de duas técnicas para remineralização do esmalte Comparison of two techniques for enamel remineralization. *Pesqui Odontol ...*, 16(1), 89–92. Retrieved from <http://www.scielo.br/pdf/pob/v16n1/a15v16n1.pdf>

Chaussain, C., Bouazza, N., Gasse, B., Laffont, A., Vital, S., Davit-Beal, T., ... Sire, J. (2014). Dental Caries and Enamel Haplotype. *Journal of Dental Research*, 93(4), 360–365. <http://doi.org/10.1177/0022034514522060>

Chaussain-Miller, C., Fioretti, F., Goldberg, M., & Menashi, S. (2006). The Role of Matrix Metalloproteinases (MMPs) in Human Caries. *Journal of Dental Research*, 85(1), 22–32. <http://doi.org/10.1177/154405910608500104>

Chawda, J., Chaduvula, N., Patel, H., Jain, S., & Lala, A. (2011). Salivary SIgA and dental caries activity. *Indian Pediatrics*, 48, 719–721. <http://doi.org/10.1007/s13312-011-0113-y>

Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383(1-2), 30–40. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>

Clark, M., & Slayton, R. (2014). Fluoride Use in Caries Prevention in the Primary Care Setting. *American Academy of Pediatrics*, 134(3), 626–633. <http://doi.org/10.1542/peds.2014-1699>

Coimbra, F. (2015). Etiologia e tratamento. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária E Cirurgia Maxilofacial*, 50, 1–3.

Costalonga, M., & Herzberg, M. (2014). The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology Letters*, 162(2), 22–38. <http://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.08.017>

Dawes, C., Pedersen, A., Villa, A., Ekström, J., Proctor, G., Vissink, A., ... Wolff, A. (2015). The functions of human saliva: A review sponsored by the World Workshop on Oral Medicine VI. *Archives of Oral Biology*, 60(6), 863–874. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.03.004>

Deepa, T., & Thirrunavukkarasu, N. (2010). Saliva as a potential diagnostic tool. *Indian Journal of Medical Sciences*, 64(7), 293. <http://doi.org/10.4103/0019-5359.99854>

Deng, J., Jackson, L., Epstein, J., Migliorati, C., & Murphy, B. (2015). Dental demineralization and caries in patients with head and neck cancer. *Oral Oncology*, 51(9), 824–831. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.009>

Díaz-monroy, J., Contreras-bulnes, R., Olea-mejía, O., García-fabila, M., Rodríguez-vilchis, L., Sánchez-flores, I., & Centeno-pedraza, C. (2014). Chemical Changes Associated with Increased Acid Resistance of Er : YAG Laser Irradiated Enamel. *The Scientific World Journal*, 2014, 6.

Edgar, M., Dawes, C., & O'Mullane, D. (2014). Saliva and Oral Health. *Dental Tribune Middle East & Africa Edition*, (February), 15–16.

Fábián, T., Gótai, L., Beck, A., Fábián, G., & Fejérdy, P. (2009). THE ROLE OF MOLECULAR CHAPERONES (HSPAs/HSP70s) IN ORAL HEALTH AND ORAL INFLAMMATORY DISEASES: A REVIEW. *European Journal of Inflammation*, 7(2), 1721–727.

Fábián, T., Hermann, P., Beck, A., Fejérdy, P., & Fábián, G. (2012). Salivary Defense Proteins: Their Network and Role in Innate and Acquired Oral Immunity. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(12), 4295–4320. <http://doi.org/10.3390/ijms13044295>

Falcão, D., da Mota, L., Pires, A., & Bezerra, A. (2013). Sialometria: Aspectos de interesse clínico. *Rev Bras Reumatol*, 53(6), 525–531. <http://doi.org/10.1016/j.rbr.2013.03.001>

Fan, D., Iijima, M., Bromley, K. M., Yang, X., Mathew, S., & Moradian-Oldak, J. (2011a). The Cooperation of Enamelin and Amelogenin in Controlling Octacalcium Phosphate Crystal Morphology. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 194–198. <http://doi.org/10.1159/000324208>

Fan, D., Iijima, M., Bromley, K., Yang, X., Mathew, S., & Moradian-Oldak, J. (2011b). The Cooperation of Enamelin and Amelogenin in Controlling Octacalcium Phosphate Crystal Morphology. *Cells Tissues Organs*, 194(2-4), 194–198. <http://doi.org/10.1159/000324208>

Fávaro, R., Ferreira, T., & Martins, W. (2006). XEROSTOMIA : etiologia , diagnóstico e tratamento . *Revisão Current concepts on aetiology , diagnosis and treatment of.* *Clínica E Pesquisa Em Odontologia*, 2(4), 303–317.

Feio, M., & Sapeta, P. (2005). Xerostomia em cuidados paliativos. *Acta Médica Portuguesa*, 18(6), 459–65. <http://doi.org/16684486>

Fine, D. (2015). Lactoferrin: A Roadmap to the Borderland between Caries and Periodontal Disease. *Journal of Dental Research*, 94(6), 768–776. <http://doi.org/10.1177/0022034515577413>

Frenkel, E., & Ribbeck, K. (2014). Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 332–338. <http://doi.org/10.1128/AEM.02573-14>

Frenkel, E., & Ribbeck, K. (2015). Salivary Mucins Protect Surfaces from Colonization by Cariogenic. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(1), 332–338. <http://doi.org/10.1128/AEM.02573-14>

Furlan, N., Gaviao, M., Barbosa, T., Nicolau, J., & Castelo, P. (2012). Salivary cortisol, alpha-amylase and heart rate variation in response to dental treatment in children. *J Clin Pediatr Dent*, 37(1), 83–87. <http://doi.org/10.17796/jcpd.37.1.n32m21n08417v363>

Gasse, B., Grabar, S., Lafont, A., Quinquis, L., Opsahl Vital, S., Davit-Beal, T., ... Chaussain, C. (2013). Common SNPs of AmelogeninX (AMELX) and Dental Caries Susceptibility. *Journal of Dental Research*, 92(5), 418–424. <http://doi.org/10.1177/0022034513482941>

Goldberg, M., Kulkarni, A., Young, M., & Boskey, A. (2011). Dentin: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience (elite Edition)*, 3, 711–735. <http://doi.org/10.2741/e281>

Grippo, J. O., Simring, M., & Schreiner, S. (2004). Attrition, abrasion, corrosion and abfraction revisited. *The Journal of the American Dental Association*, 135(8), 1109–1118. <http://doi.org/10.14219/jada.archive.2004.0369>

Guo, L., & Shi, W. (2013). Salivary biomarkers for caries risk assessment. *Journal of the California Dental Association*, 41(2), 107–118. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3825179&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

Hagh, L., Zakavi, F., Ansarifard, S., Ghasemzadeh, O., & Solgi, G. (2013). Association of dental caries and salivary sIgA with tobacco smoking. *Australian Dental Journal*, 58(2), 219–223. <http://doi.org/10.1111/adj.12059>

Hof, W. V., Veerman, E. C. I., Amerongen, A. V. N., & Ligtenberg, A. J. M. (2014). Antimicrobial defense systems in saliva. *Monographs in Oral Science*, 24, 40–51. <http://doi.org/10.1159/000358783>

Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H., Song, Z., Moser, C., Jensen, P., ... Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2), 55–65. <http://doi.org/10.4248/IJOS11026>

Kho, H. (2014). Understanding of Xerostomia and Strategies for the Development of Artificial Saliva. *The Chinese Journal of Dental Research*, 17(2), 75–83.

Klein, M., Hwang, G., Santos, P., Campanella, O., & Koo, H. (2015). Streptococcus mutans-derived extracellular matrix in cariogenic oral biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 5(February), 1–8. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00010>

Kościełniak, D., Jurczak, A., Zygmunt, A., & Krzyściak, W. (2012). Salivary proteins in health and disease. *Acta Biochimica Polonica*, 59(4), 451–457.

Larmas, M., & Sándor, G. (2014). Enzymes, Dentinogenesis and Dental Caries: a Literature Review. *Journal of Oral and Maxillofacial Research*, 5(4), 1–12. <http://doi.org/10.5037/jomr.2014.5403>

Levin, M. (2011). *Topics in Dental Biochemistry*. (Springer, Ed.).

Levine, M. (2011). Susceptibility to Dental Caries and the Salivary Proline-Rich Proteins. *International Journal of Dentistry*, 2011, 1–13. <http://doi.org/10.1155/2011/953412>

Lima, J. (2007). Cárie dentária : um novo conceito. *R Dental Press Ortodon Ortop Facial*, 119–130.



Liu, J., & Duan, Y. (2012). Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncology*, 48(7), 569–577. <http://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.01.021>

Llena-Puy, C. (2006). The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *Medicina Oral, Patología Oral Y Cirugía Bucal*, 11(5), E449–55.

Loreto, C., Galanti, C., Musumeci, G., Rusu, M., & Leonardi, R. (2014). Immunohistochemical analysis of matrix metalloproteinase-13 in human caries dentin. *European Journal of Histochemistry* 2014, 58(1). <http://doi.org/10.4081/ejh.2014.2318>

Luc, A., Ospina-cata, A., Arango-rinc, C., & Mar, C. (2013). Effect of secretory IgA on the adherence of *Streptococcus Mutans* on human teeth Artículos Artículos. *Revista CES Odontologia*, 26(2), 76–106.

McDonald, E., Goldberg, H., Tabbara, N., Mendes, F., & Siqueira, W. (2011). Histatin 1 resists proteolytic degradation when adsorbed to hydroxyapatite. *Dent Res*, 90(2), 268–72.

Moradian-Oldak, J. (2013). Protein- mediated enamel mineralizatio. *Frontiers in Bioscience*, 17, 1996–2023.

Murray, R. K., Rodwell, V. W., Bender D., Botham, K. M., Well, P.A. & Kennelly, P. J. (2012). *Harper`s Illustrated Biochemistry* (28ªed). Mc Graw Hill Education, LANGE Textbooks. ISBN: 0-07-162591-7.

Nauntoft, B., Tenovuo, J., & Lagerlof, F. (2005). Cárie dentária\_ a doença e seu tratamento clínico.pdf (pp. 7–26). São Paulo.

Navarro, V. P., Nelson-Filho, P., Silva, L. A. B. & Freitas, A. C. (2006). A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Revista de Odontologia da UNESP*, 35(4): 233-38.

Nunes, L., Mussavira, S., & Bindhu, O. (2015). Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochemia Medica*, 25(2), 92–177. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.11613/BM.2015.018>

Ochai, A., Harada, K., Hashimoto, K., Shibata, K., Ishiyama, Y., Mitsui, T., ... Taniguchi, M. (2014).  $\alpha$ -Amylase is a potential growth inhibitor of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium. *JOURNAL OF PERIODONTAL RESEARCH*, 49, 62–68. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.008>

Ochiai, A., Harada, K., Hashimoto, K., Shibata, K., Ishiyama, Y., Mitsui, T., ... Taniguchi, M. (2014).  $\alpha$ -Amylase is a potential growth inhibitor of *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogenic bacterium. *Journal of Periodontal Research*, 49(1), 62–68. <http://doi.org/10.1111/jre.12079>

Olivier, J. (2014). Flúor en aguas de consumo público españolas y prevención de la caries dental. *Cartas a La Directora / Gac Sanit.*, 28(3), 253–259. <http://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>

Perez-vilar, J. (2007). Translational Reviews Mucin Granule Intraluminal Organization. *AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY CELL AND MOLECULAR BIOLOGY*, 36, 183–190. <http://doi.org/10.1165/rcmb.2006-0291TR>

Quinn, Simone, Braxton, & Louis. (2013). *Salivary Glands: Anatomy, Functions in Digestion and Role in Disease*.

Quintas, A., Freire, A., & Halpern, M. (2008). Bioquímica- organização molecular da vida. *Cirurgia Y Cirujanos*, 784.

Ranadheer, E., Nayak, U., Reddy, N., & Rao, V. (2011). The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 29(2), 106–112.

Rudney, J., Staokov, R., & Johnson, J. (2009). *Archives of Oral Biology* (pp. 91–100).

Sala, E., & García, P. (2013). *Odontología preventiva y comunitaria principios, métodos y aplicaciones*. (E. Masson, Ed.) (4.<sup>a</sup> edición).

Samaranayake, Y., Cheung, B., Parahitiyawa, N., Seneviratne, C., Yau, J., Yeung, K., & Samaranayake, L. (2009). Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces. *Archives of Oral Biology*, 54(2), 115–126. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2008.09.015>

Shimada, Y., Ichinose, S., Sadr, A., Burrow, M., & Tagami, J. (2009). Localization of matrix metalloproteinases (MMPs-2, 8, 9 and 20) in normal and carious dentine. *Australian Dental Journal*, 54(4), 347–354. <http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01161.x>

Simón-Soro, A., & Mira, A. (2015). Solving the etiology of dental caries. *Trends in Microbiology*, 23(2), 76–82. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2014.10.010>

Singh, S., Sharma, A., Sood, P., Sood, A., Zaidi, I., & Sinha, A. (2015). Saliva as a prediction tool for dental caries: An in vivo study. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 5(2), 59–64. <http://doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.05.001>

Slavish, D., Graham-Engeland, J., Smyth, J., & Engeland, C. (2015). Salivary markers of inflammation in response to acute stress. *Brain, Behavior, and Immunity* (Vol. 44). Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.08.008>

Soares, G., Souza, P., Purger, F., Vasconcellos, A., & Ribeiro, A. (2012). Métodos de detecção de cárie. *Revista Brasileira de Odontologia*, 69(1), 84–89.

Retrieved

from

[http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-72722012000100019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt](http://revodonto.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72722012000100019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt)

Sousa, A. (2014). A Importância do Xilitol na Prevenção da Cárie Dentária, 91. Retrieved from [http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4610/1/PPG\\_21322.pdf](http://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/4610/1/PPG_21322.pdf)

Spielmann, N., & Wong, D. (2011). Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. *Oral Diseases*, 17(4), 345–354. <http://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2010.01773.x>

Struzycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology / Polskie Towarzystwo Mikrobiologów = The Polish Society of Microbiologists*, 63(2), 127–135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25115106> <http://www.pjm.microbiology.pl/archive/vol6322014127.pdf>

Tonguc-Altin, K., Sandalli, N. ., Duman, G., Selvi-Kuvvetli, S., Topcuoglu, N., & Kulekci, G. (2015). Development of novel formulations containing Lysozyme and Lactoferrin and evaluation of antibacterial effects on Mutans Streptococci and Lactobacilli. *Archives of Oral Biology*, 60(5), 706–714. <http://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.02.004>

Triana, B., Soto, O., Aleida, E., & Bernabeu, A. (2012). Principales proteínas salivales : estructura , función y mecanismos de acción Salivary proteins : structure , function and mechanisms of action. *Scielo*, 11(4), 450–456. Retrieved from <http://scielo.sld.cu/pdf/rhcm/v11n4/rhcm04412.pdf>

Vasudevam, D., Sreekumari, & Vaidyanathan, K. (2011). textbook of Biochemistry, of dental students. *Textbook of Biochemistry, for dental students (Vol. 2)*.

Villa, A., Connell, C., & Abati, S. (2015). Diagnosis and management of xerostomia and hyposalivation. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11, 45–51. <http://doi.org/10.2147/TCRM.S76282>

Vitorino, R., Guedes, S., Ferreira, R., Lobo, M., Duarte, J., Ferrer-Correia, A., ... Amado, F. (2006). Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility. *European Journal of Oral Sciences*, 114(2), 147–153. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00328.x>

Vukosavljevic, D., Custodio, W., Cury, A., & Siqueira, W. (2012). Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* (Chichester, England), 29, 459–466. <http://doi.org/10.1002/yea.2925>

West, N., & Joiner, A. (2014). Enamel mineral loss. *Journal of Dentistry*, 42, S2–S11. [http://doi.org/10.1016/S0300-5712\(14\)50002-4](http://doi.org/10.1016/S0300-5712(14)50002-4)

Xavier, A., Pinto, T., & Cavalcanti, A. (2012). Lesões Cervicais não cariosas : um panorama atual Non-carious cervical lesions : a current view. *Revista Odontologica Universidade São Paulo*, 24(1), 57–66.

Yoshizaki, K., & Yamada, Y. (2013). Gene evolution and functions of extracellular matrix proteins in teeth. *Orthodontic Waves* (English Ed.), 72(1), 1–10. <http://doi.org/10.1016/j.odw.2013.01.040>

Zakhary, G., Clark, R., Bidichandani, S., Owen, W., Slayton, R., & Levine, M. (2007). Acidic proline-rich protein Db and caries in young children. *Journal of Dental Research*, 86(12), 1176–1180. <http://doi.org/10.1177/154405910708601207>

Zheng, L., Amano, K., Iohara, K., Ito, M., Imabayashi, K., Into, T., ... Nakashima, M. (2009). Matrix Metalloproteinase-3 Accelerates Wound Healing following Dental Pulp Injury. *The American Journal of Pathology*, 175(5), 1905–1914. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080705>